

PCT/CZ2003/000078

29.12.2003

ČESKÁ REPUBLIKA

REC'D 18 FEB 2004

WIPO

PCT

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

potvrzuje, že

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AKADEMIE VĚD  
ČESKÉ REPUBLIKY, Praha, CZ

podal(i) dne 30.12.2002

přihlášku vynálezu značky spisu PV 2002-4273

a že připojené přílohy se shodují úplně  
s původně podanými přílohami této přihlášky.

*Schneiderová*  
Za předsedu: Ing. Eva Schneiderová

V Praze dne 12.2.2004



PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

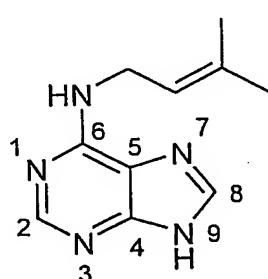
Substituční deriváty  $N^6$ -benzyladenosinu, způsob jejich přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv, kosmetických přípravků a růstových regulátorů, farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující

#### Oblast techniky

Vynález se týká nových substitučních derivátů  $N^6$ -benzyladenosinu, které mají protinádorové, mitotické, imunosupresivní a antisenescentní účinky pro rostlinné, živočišné i lidské buňky, způsob přípravy těchto derivátů a jejich použití jako léčiva, farmaceutické kompozice, které tyto deriváty obsahují jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologickém, v kosmetickém průmyslu a v zemědělství.

#### Dosavadní stav techniky

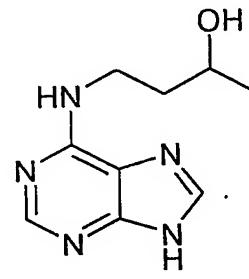
Cytokininy jsou chemicky charakterizovatelné jako  $N^6$ -substituované deriváty adeninu. Současná nomenklatura založená na systému navrženém Lethamem (Planta 181: 361-364, 1974) a Lethamem a Palním (Ann. Rev. Plant. Physiol. 34: 163-197, 1983) byla původně navržena pro zeatin (Z) a isopentenyladenin (iP). Konjugace purinového kruhu bývá označována číslem polohy substituentu, tak jak je znázorněno v přehledu pro iP.



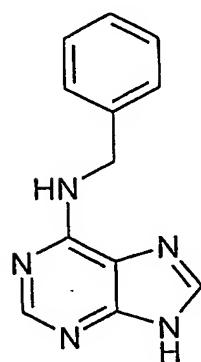
iP



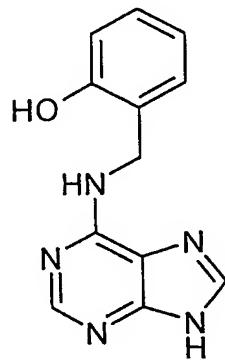
Z



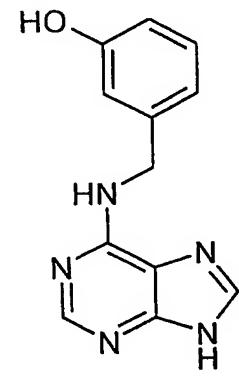
DHZ



BAP



oT



mT

Ve výše uvedeném přehledu chemických vzorců základních cytokininových basí značí iP - N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin, Z - *trans*-zeatin, DHZ - dihydrozeatin, BAP - 6-benzylaminopurin, oT - *ortho*-topolin, mT - *meta*-topolin.

Cytokininy lze rozdělit v závislosti na povaze N<sup>6</sup>-postranního řetězce na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní jsou reprezentovány cytokininy odvozenými od následujících basí: N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin. Mezi aromatické cytokinininy patří 6-benzylaminopurin, *meta*- a *ortho*-topolin a jejich metabolity.

V případě isoprenoidních cytokininů hraje významnou roli konjugace, zahrnující modifikace purinového jádra a N<sup>6</sup>-postranního řetězce. Hlavními formami cytokininových konjugátů v rostlinách jsou 9-ribosidy, 9-ribotidy, 3-, 7-, 9- a O-glukosidy, O-xylosidy, 9-ribosylglukosidy, O-acetyl a O-allyl deriváty a rovněž konjugáty cytokininů s alaninem (viz. detailey Mok, D.W.S., Mok, M.C.: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994).

Zatímco volné báse představují aktivní formy cytokininů (Laloue a Pethe, In: Wareing, P.F. (ed.): *Plant Growth Substances* 1982. Pp. 185-195. Academic Press, London 1982), jejich ribosidy jsou důležitými transportními formami v xylému a dominantními formami v rostlinných pletivech. Centrálními sloučeninami v metabolismu cytokininů jsou ribosid-5'-monofosfáty (Laloue et al. *FEBS Let.* 46: 45-50, 1974; *Physiol. Veg.* 13: 781-796, 1975; *Plant Physiol.* 59: 478-483, 1977; In: Guern, J., Péaud-Lenoë, C., (eds.): *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Pp. 80-96. Springer-Verlag, Berlin 1981; Mok et al., *J. Plant Physiol.* 130: 423-431, 1987), které zůstávají akumulovány v buňkách i proti vysokému koncentračnímu gradientu, a to díky nepropustnosti buněčných membrán pro tyto metabolity (Laloue et al., 1974, 1975, Laloue a Pethe In: Wareing, P.F. (ed.): *Plant Growth Substances* 1982. Pp. 185-195. Academic Press, London 1982.).

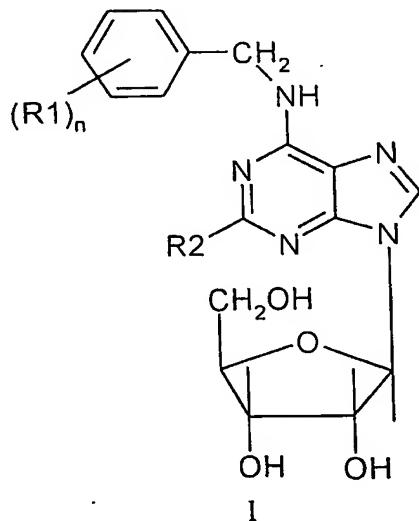
Cytokininy plní v rostlinách velmi rozmanité funkce, a to od buněčného dělení, prodlužování a diferenciace, až k tvorbě květů a plodů. Ruší dormanci semen, potlačují apikální dominanci a stimulují růst postranních pupenů, zpomalují stárnutí buněk, zvyšují odolnost proti stresům, ovlivňují permeabilitu buněčných membrán a vyvolávají akumulaci metabolitů v místě jejich aplikace (Letham a Palni 1983 - *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 34: 163-197, 1983, Mok, D.W.S., Mok, M.C.: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. CRC Press, Boca Raton, London, Tokyo 1994).

Vzhledem k tomu, že se veškeré organismy na Zemi evolučně vyvíjely společně po mnoho desítek miliónů let, je předpokladatelné, že pro látky rostlinného původu, jakými cytokininy zaručeně jsou, si příroda nalezla mnoho regulačních vazeb k živočichům, a tedy i k člověku. Látky cytokininové povahy proto zřejmě ovlivňují značné množství molekulárních mechanismů v živočišných i lidských buňkách. Nedávno jsme zjistili, že N<sup>6</sup>-substituované adenosiny a jejich deriváty mohou být základem pro vývoj nových generací léčiv s protinádorovými, antiinflamatorními, imunosupresivními, antivirálními a dalšími, medicínsky významnými účinky.

Cílem tohoto vynálezu je proto poskytnout protinádorové, imunosupresivní, růstově regulační, morfogeneticky aktivní a antisenescenční dusíkaté heterocyklické sloučeniny derivátů na bázi C2- a na fenu substituovaného 6-benzylaminopurin ribosidu s vysokou selektivitou a terapeutickým indexem účinnosti, tj. sloučeniny, které jsou málo toxické a přitom vysoko účinné.

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce 1



a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve kterých R2 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, methylmerkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl skupinu, a

(R1)<sub>n</sub>, ve které

n znamená 2 až 6 uhlíkový atom fenu substituovaný jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující R1 kde

R1 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, methylmerkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl alkyl, substituovaný alkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkylalkyl, arylalkyl, heteroalkyl, heteroarylalkyl, cykloheteroalkyl alkyl nebo R1'-X, ve které

X znamená NH-, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl)-, skupinu -O- nebo skupinu -S- a

R1', znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, acyl, amido, sulfo, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, arylalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný cykloheteroalkyl, heteroarylalkyl, heteroalkyl, cykloalkyl alkyl a cykloheteroalkyl alkyl.

Výše uvedené dosud nevymezené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, přičemž

halogen znamená

atom halogenu vybraný ze skupiny zahrnující atom fluoru, atom bromu, atom chloru a atom jodu,

alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

substituovaný alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karbyloxy znamená

.skupinu  $-OR_a$ , ve které  $R_a$  znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karbylmerkapto znamená

.skupinu  $-SR_b$ , ve které  $R_b$  znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### sulfu znamená $-SO_3R_c$ , ve které $R_c$ znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů, .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů, .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty zvoleným ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfido, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### sulfoamido znamená $-NHSO_3R_d$ , kde $R_d$ znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů, .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

#### acyl znamená

skupinu  $-C(O)R_e$ , ve které  $R_e$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

#### aryloxy znamená

skupinu  $-OAr$ , ve které  $Ar$  znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

#### alkylamino znamená

skupinu  $NR_fR'_g$ , ve které  $R_f$  a  $R'_g$  nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

#### amido znamená

skupinu  $-C(O)NR_hR'_i$ , ve které  $R_h$  a  $R'_i$  nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karboxyl znamená

skupinu  $-C(O)OR_j$ , ve které  $R_j$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karbamino znamená

skupinu  $-NHCOR_k$ , ve které  $R_k$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### aryl znamená

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

### substituovaný aryl znamená

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jednímaž pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### heterocyklus znamená

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

### heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický.

### substituovaný heteroaryl znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### arylalkyl znamená

.skupinu -R<sub>1</sub>-Ar, kde Ar znamená arylovou skupinu a R<sub>1</sub> znamená  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### heteroalkyl znamená

.skupinu -R<sub>m</sub>-L, ve které R<sub>m</sub> znamená  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a L znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heteroarylalkyl znamená

.skupinu  $-R_n-G$ , ve které  $R_n$  znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a G znamená

.heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, přičemž

alespoň jeden heterocyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

**cycloalkyl** znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,

**substituovaný cycloalkyl** znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

**heterocycloalkyl** znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, nebo fosfor,

**substituovaný cykloheteroalkyl** znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl

a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

**cykloalkylalkyl znamená**

.skupinu  $-R_o-J$ , ve které  $R_o$  znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a  $J$  znamená

.monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, nebo  
 .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě, a

**a heterocycloalkylalkyl znamená**

.skupinu  $-R_p-V$ , ve které  $R_p$  znamená  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze

skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

## a V znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatolem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu,

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atomem fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu ze skupiny zahrnující: 6-(2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-karboxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-nitrobenzylamino)purin ribosid.

nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-methylaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
hexylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-hexyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
ethylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-pentylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
penthydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fenoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
fenylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-propylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
propyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-oktylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
octyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-ethyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-
diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-
diaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dibromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dibromo-
4-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,4-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,6-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
6-(2,4-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-
difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-fluoro-2-
(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
ribosid,	6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin		ribosid,	

(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin purin ribosid, 6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl) benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-



trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-diiodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin

ribosid, 6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butyl/benzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,

bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-karboxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-karboxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-



methylmercapto)-6-(2,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-



methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-

(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-5,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy,







diodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid,

2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin

ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid.

Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-chloropurin ribosid připravený z hypoxanthinu chlorací pomocí  $\text{POCl}_3$  (Davoll and Blowy, J. Am. Chem. Soc. 73:2936 (1957)) anebo je komerčně dostupný (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 6-bromopurin ribosid, který je možné buď připravit z adeninu nebo hypoxanthinu reakcí s n-pentyl nitritem v tribrommetanu, nebo je komerčně dostupný. Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je také 6-fluoropurin ribosid, který lze připravit z 6-chloropurinu ribosidu reakcí s triethylaminem za vzniku kvarterní amoniové soli, která pak reakcí s tetrabutylammonium triphenyldifluorosilikátem v dimethylformamidu může být konvertována na 6-fluoropurin ribosid (Gurvich et al., Nucleos. Nucleot. 18: 2327 (1999)).

Dalším výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I jsou substituované benzylaminy. Ty, které obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin, nejsou komerčně dostupné a mohou být připraveny demethylaci příslušných methoxyderivátů pomocí 48% HBr v atmosféře dusíku N<sub>2</sub>.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy substitučních derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I, ve kterém R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> mají výše uvedené významy a jehož podstata spočívá v tom, že se v jednom přístupu dusíkatý heterocyklický derivát obecného vzorce I, ve kterém R<sub>3</sub> znamená atom chloru nebo bromu nebo fluoru nebo skupinu methylthio a ve kterém R<sub>2</sub> má výše uvedený význam, nukleofilně substituuje v poloze 6 za účelem převedení atomu chloru, bromu nebo fluoru v poloze 6 za některý jiný z významů obecného substituentu R<sub>1</sub> uvedených výše za vzniku derivátu obecného vzorce I.

Pro jejich přípravu lze s výhodou využít příslušné 2-chloro, 2-hydroxy, 2-amino, 2-methylmercaptopo deriváty 6-chloropurin ribosidu (Nair and Young, *Synthesis* 6: 450 (1986); Nair and Fasbender, *Tetrahedron* 49: 2169 (1993)).

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.

Předložený vynálezu rovněž zahrnuje farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky obsahující sloučeninu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučeniny obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagencii pro imunodetekci, diagnostických vzorků, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.

Dále je předmětem vynálezu použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritis, lupusu, diabetu I typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickému onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitozách způsobených

houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi immunostimulace.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, jako keratinocytů či fibroblastů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

Předmětem vynálezu je rovněž použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

Předmětem vynálezu je konečně použití dusíkaté heterocyklické sloučeniny na bázi substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

#### Terapeutická aplikace

Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitréální, nitrožilní, intradermální, intrathekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95% aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90% aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20% aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou například potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou například masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0.05g do 1.0g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky tohoto vynálezu jsou připravovány známým způsobem, například běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

Přednostně jsou používány roztoky aktivních láték a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, které mohou být připraveny před

použitím, například v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je manitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány anebo obsahují látky neutrální povahy, například konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovadla anebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku anebo pufry. Jsou připravovány známým způsobem, například běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspense mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako například sodnou sůl karboxymethylcelulosu, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspense obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8-22, s výhodou pak 12-22 uhlíkových atomů, například kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, například kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přídavkem antioxidantů, například vitaminu E,  $\beta$ -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydrická, například mono-, di- nebo trihydrické alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou například ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoseé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou oleje z meruňkových jader a složený z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž), „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce  $C_8$  až  $C_{12}$  od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sesamový olej, sójový olej a olej z podzemnice olejný.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, například plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

Farmaceutické přípravky například pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přídavkem dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, například laktosa, sacharosa, manitol nebo sorbitol, celulosové preparáty anebo fosforečnan vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosy a polyvinylpyrrolidin, a pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítěný polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být vybavena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulosových preparátů jako acetylcelulosafatalát nebo hydroxypropylmethylcelulosafatalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávána do tablet nebo potahovaných tablet například pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky které mohou být užívány orálně jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou například s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpouštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty například typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

Ostatní formy orálního podávání jsou například sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku například v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20%, přednostně okolo 10% nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, například když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou například práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, například v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou například čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou například přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, například ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, například sodnou sůl karboxymethylcelulosy, sorbitol nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s neutrálními látkami kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity například pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70%, ale přednostně 20 až 50% vody nebo vodní fáze. Tukovou fázi tvoří uhlovodíky, například vazelina, parafinový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, například cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou například smáčedla jako polyalkoholy, například glycerol, propylen glykol, sorbitol a polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či přijemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, například parafin, vazelinu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, například hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo hydrogenované oleje, například hydrogenovaný ricínový olej nebo z podzemnice olejná, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, například glycerol mono- a distearát. Dále obsahují například mastné alkoholy, emulgátory a aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50% vody. Používané olejové báze jsou mastné alkoholy, například isopropyl myristát, lanolin, včelí vosk, nebo uhlovodíky, s výhodou vazelína (petrolátum) a parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, například estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, například polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery či kyselé estery polyglycerických mastných kyselin (Tween), dále polyoxyethylenové etery mastných alkoholů

nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylulfát sodný nebo stearylulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, například cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, například polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, například oxid titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako chloro-fluoro nižší alkany, například dichlorofluoromethan a dichlorotetrafluoroethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch,  $N_2O$  či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolickou bázi, ke které jsou přimíchány zvlhčovadla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, například glycerol, glykoly a polyethylen glykol, dále promazávadla jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné i ostatní neutrální látky a aditiva.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, například člověka, vyžadujícího takovéto ošetření je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0.1 až 50g, s výhodou 0.5 až 10 g.

V dalším jsou nové sloučeniny obecného vzorce I a způsoby jejich přípravy a použití osvětleny na příkladech, aniž se tím jakoliv omezují.

### Přehled příkladů

Na obr. 1 je znázorněna indukce proteinu p21<sup>WAF-1</sup> v buňkách MCF-7 působením rozdílných koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek  $\mu$ mol na litr kultivačního média.

Na obr. 2 je znázorněna indukce p21<sup>WAF-1</sup> v buňkách MCF-7 v rozmezí 6-24 hodin po přídavku 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino) purin ribosid) v 1  $\mu$ M koncentraci.

Na obr. 3 je znázorněna inhibice růstu nádorových buněčných linii CEM (A) and HL60 (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální activity (v nepřítomnosti inhibitoru). ZR: zeatin ribosid; oTR: *ortho*-topolin ribosid; 3F-BAPR: 6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid; 3Cl-4FBAPR: 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid; 2OH3MeOBAPR: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino) purin ribosid.

Na obr. 4 je znázorněna inhibice proliferace buněk HL-60 indukovaná 2OH3MeOBAPR. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v koncentraci 2.5 $\mu$ M (plné kroužky), 5 $\mu$ M (prázdné čtverce), 10 $\mu$ M (plné čtverce), 20 $\mu$ M (prázdné trojúhelníky), 40 $\mu$ M (plné trojúhelníky) a 60 $\mu$ M (prázdné šestiúhelníky). Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola (prázdné kroužky).

Na obr. 5 je znázorněna indukce apoptosis 2OH3MeOBAPR u buněk HL-60. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v uvedených koncentracích. Po 24 h inkubaci byl sledován výskyt apoptotických buněk vzhledem k morfologii jader. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola.

Obr. 6 znázorňuje vliv 2OH3MeOBAPR na morfologii jader u buněk HL-60. Jádra buněk kultivovaných za standardních podmínek v médiu bez 2OH3MeOBAPR a), jádra buněk kultivovaných v médiu s přídavkem 5  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24 hodin b)

Obr. 7 znázorňuje vliv 2OH3MeOBAPR na integritu jaderné DNA u buněk HL-60. M - standardy molekulové hmotnosti. Pozice 1- DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu bez iPA. Pozice 2-6 DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu s přídavkem 5, 10, 20 40 a 60  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24 h.

Na obr. 8 je znázorněn vliv 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid) na buněčný cyklus. Buňky byly kultivovány a) ve standardním v médiu bez 2OH3MeOBAPR (kontrola), b) v médiu obsahujícím 5  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24h před analýzou pomocí průtokové cytometrie.

Na obr. 9 je znázorněn vliv 2OH3MeOBAPR na aktivaci kaspázových proteáz. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce), buňky kultivované v médiu obsahujícím 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (černé sloupce). Relativní hydrolýza substrátu pro kaspázu-9 Ac-LEHD-AFC a) a kaspázu-3 Ac-DEVD-AMC b).

Obr. 10 znázorňuje vliv kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 50 $\mu$ M Z-VAD-FMK (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.

Na obr. 11 je znázorněn vliv inhibitoru adenosin kinázy 4-amino-3-iodo-1 $\beta$ -D-ribofuranosylpyrazolo [3,4-d]-pyrimidine (AIRPP), na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 1 $\mu$ M AIRPP (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.

Obr. 12 znázorňuje vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $57,7 \pm 0,9$ .

Na obr. 13 je znázorněn vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přímka —— představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $2,5 \pm 0,3$  g.

Na obr. 14 je znázorněn vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbancí při 537 a 620 nm.

Obr. 15 ukazuje relativní počet explantátů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase (■: BAP, ●: mT, ▲: mMeOBAPR). Obr. 16. Relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAPR).

Obr. 16 ukazuje relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ●: mT, ▲: mMeOBAPR).

Na obr. 17 je znázorněn vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na mediu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na mediu s mMeOBAPR po 121 dnech kultivace.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

3 mmol 6-chloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 2,3,6-trifluorbenzylaminu a 5 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrytalován v etanolu. B.t. 196°C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 92 %.

Tabulka 1

Látky připravené způsobem podle příkladu 1

Substituent	Elementární analýza			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]	Bod tání (°C)
	%C	%H	%N		
2-fluorobenzylamino	54,4/54,1	4,8/4,8	18,7/18,4	376	191-192
3-fluorobenzylamino	54,4/53,9	4,8/4,7	18,7/18,2	376	153-154
4-fluorobenzylamino	54,4/54,3	4,8/4,8	18,7/18,3	376	177-178
2-chlorobenzylamino	52,1/52,0	4,6/4,7	17,9/17,5	392	183-184
3-chlorobenzylamino	52,1/51,9	4,6/4,6	17,9/17,3	392	164-165
4-chlorobenzylamino	52,1/51,8	4,6/4,5	17,9/17,1	392	181-182
2-bromobenzylamino	46,8/46,3	4,16/4,1	16,05/15,5	436	180-181
3-bromobenzylamino	46,8/47,8	4,16/4,5	16,05/15,6	436	173-174
4-bromobenzylamino	46,8/46,9	4,16/4,3	16,05/15,4	436	175-176
3-jodobenzylamino	41,0/41,4	2,8/2,8	20,0/19,5	484	184-185
2-methylbenzylamino	58,2/57,88	5,7/5,5	18,86/18,3	372	174-175
3-methylbenzylamino	58,2/57,9	5,7/5,44	18,86/18,2	372	162-163
4-methylbenzylamino	58,2/58,5	5,7/5,9	18,86/18,3	372	164-166
2-methoxylbenzylamino	55,8/54,95	5,46/5,2	18,1/17,73	388	164-166
3-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,46/5,7	18,1/17,96	388	162-163

4-methoxylbenzylamino	55,8/55,33	5,46/5,2	18,1/17,7	388	154-156
2,4-dichlorobenzylamino	47,9/47,98	4,0/4,03	16,4/15,9	426	205-206
3,4-dichlorobenzylamino	47,9/47,3	4,0/4,3	16,4/16,12	426	194-195
2,3-dihydroxybenzylamino	52,4/52,1	4,9/5,0	18,0/18,2	390	184-186
3,5-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,2	18,0/17,6	390	187-188
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	53,6/54,0	5,2/5,4	17,4/17,1	404	208-209
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	53,6/53,1	5,2/5,6	17,4/17,0	404	218-219
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,8	5,6/5,5	16,8/16,4	418	177-179
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,3	5,6/5,7	16,8/16,3	418	208-210
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,45	5,6/5,5	16,8/16,3	418	156-157
3,5-dimethoxybenzylamino	54,67/54,7	5,6/5,5	16,8/16,4	418	174-175
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino	52,6/52,5	5,3/5,2	16,2/16,3	434	200-201
2,4-difluorobenzylamino	51,9/51,4	4,4/4,3	17,8/17,7	394	171-172
3,5-difluorobenzylamino	51,9/51,2	4,4/4,3	17,8/17,6	394	178-178
2,3,4-trifluorobenzylamino	49,6/49,1	3,9/3,7	17,0/16,8	412	192-193
2,4,5-trifluorobenzylamino	49,6/49,0	3,9/3,8	17,0/16,4	412	175-176
2,3,6-trifluorobenzylamino	49,6/49,0	3,9/3,7	17,0/16,4	412	195-196
3-chloro-4-fluorobenzylamino	49,8/49,2	4,2/4,1	17,1/16,8	411	148-149

## Příklad 2

3 mmol 6-chloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 2-hydroxy-3-methoxybenzylaminu a 5 mmolů diisopropylethylaminu. Roztok byl zahříván na 60 °C po dobu 18 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. B.t. 209°C. TLC: chloroform-metanol-amoniac (90:9:0,1). Výtěžek 92 %.

Tabulka 2  
Látky připravené způsobem podle příkladu 2

Substituent	Elementární analýza			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]	Bod tání (°C)
	%C	%H	%N		
2-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,5/5,7	18,1/18,3	388	165-166
3-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,46/5,7	18,1/17,96	388	163-164
4-methoxylbenzylamino	55,8/55,33	5,46/5,2	18,1/17,7	388	156-157
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,7	16,8/17,0	418	178-179
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,4	5,6/5,7	16,8/16,9	418	209-210
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,5	16,8/16,3	418	157-158
3,5-dimethoxybenzylamino	54,7/54,7	5,6/5,5	16,8/16,4	418	176-177
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,3	17,4/17,6	404	209-211
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,4	17,4/17,6	404	219-220
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino	52,6/52,4	5,3/5,4	16,2/16,3	434	202-203

### Příklad 3

3 mmoly 6-fluorpurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml isopropanolu a bylo přidáno 8 mmolů 2,3-dihydroxybenzylaminu hydrobromidu a 10 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 60 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. B.t. 196 °C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:0,1). Výtěžek 89 %.

Tabulka 3  
Látky připravené způsobem podle příkladu 3

Substituent	Elementární analýza			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]
	%C	%H	%A	
2,3-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,0	18,0/18,2	390
3,5-dihydroxybenzylamino	52,4/52,2	4,9/5,0	18,0/17,8	390
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	53,6/53,9	5,2/5,3	17,4/17,2	404
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	53,6/53,3	5,2/5,4	17,4/17,2	404
2,3-dimethoxybenzylamino	54,7/54,8	5,6/5,5	16,8/16,6	418
2,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,3	5,6/5,7	16,8/16,5	418
3,4-dimethoxybenzylamino	54,7/54,5	5,6/5,5	16,8/16,5	418
3,5-dimethoxybenzylamino	54,7/54,7	5,6/5,5	16,8/16,6	418
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino	52,6/52,3	5,3/5,2	16,2/16,4	434

#### Příklad 4

##### 2-chloro-6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosid

3 mmol 2,6-dichloropurin ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 3-methoxybenzylaminu a 5 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1). Výtěžek 85 %.

Tabulka 4  
Látky připravené způsobem podle příkladu 4

Substituent ( $R_2=Cl$ )	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES-MS [ $M+H^+$ ]
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	53,3/52,8	5,0/5,2	17,3/17,6	406
3-methylbenzylamino	53,3/52,7	5,0/5,3	17,3/17,8	406
4-methylbenzylamino	53,3/52,9	5,0/5,2	17,3/17,6	406
2-methoxylbenzylamino	51,2/50,6	4,8/5,0	16,6/16,9	422
3-methoxylbenzylamino	51,2/50,9	4,8/4,9	16,6/17,0	422
4-methoxylbenzylamino	51,2/50,7	4,8/5,0	16,6/16,9	422
2,3-dimethoxybenzylamino	50,5/50,0	4,9/4,7	15,5/15,8	452
2,4-dimethoxybenzylamino	50,5/50,2	4,9/4,9	15,5/15,6	452
3,4-dimethoxybenzylamino	50,5/49,7	4,9/4,5	15,5/16,1	452
3,5-dimethoxybenzylamino	50,5/50,2	4,9/4,7	15,5/15,8	452

#### Příklad 5

2-amino-6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid

3 mmol 2-amino-6-chloropurinu ribosidu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmoly 3-methoxybenzylaminu a 5 mmolů triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekristalován v etanolu. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1). Výtěžek 86 %.

Tabulka 5  
Látky připravené způsobem podle příkladu 5

Substituent ( $R_2=NH_2$ )	Elementární analýza			ES-MS [M+H <sup>+</sup> ]
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	56,0/55,4	5,7/5,9	16,6/16,9	387
3-methylbenzylamino	56,0/55,6	5,7/5,7	16,6/16,9	387
4-methylbenzylamino	56,0/55,6	5,7/5,8	16,6/16,7	387
2-methoxylbenzylamino	53,7/53,1	5,5/5,7	20,9/21,2	403
3-methoxylbenzylamino	53,7/53,2	5,5/5,7	20,9/21,3	403
4-methoxylbenzylamino	53,7/53,3	5,5/5,6	20,9/21,2	403
2,3-dimethoxybenzylamino	52,8/52,4	5,6/5,7	19,4/19,6	403
2,4-dimethoxybenzylamino	52,8/52,5	5,6/5,7	19,4/19,6	433
3,4-dimethoxybenzylamino	52,8/52,0	5,6/6,0	19,4/19,9	433
3,5-dimethoxybenzylamino	52,8/52,1	5,6/5,9	19,4/19,9	433

### Příklad 6

#### Inhibice senescence živočišných buněk

V tomto příkladě, lidské diploidní fibroblasty (HCA buňky s rozdílnou úrovní pasážování: pasáž 25 - označení HCA25; pasáž 45 - označení HCA45; pasáž 80 - označení HCA80) byly použity pro studium  $\beta$ -galactosidasové aktivity. Medium použité pro kultivaci buněk bylo odstraněno, buňky byly promyty 2-krát PBS a fixovány ve 2-3 ml fixačního činidla skládajícího se ze 2% formaldehydu a 0.2% glutaraldehydu v PBS. Buňky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 min. a poté 2-krát promyty PBS. Buňky byly pak inkubovány při 37 °C (bez CO<sub>2</sub>) po dobu 1 až 16 hodin ve 2-3 ml roztoku obsahujícího ferrikyanid draselný (5 mM), ferrokyanid draselný (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) (1 mg/ml), v citrát/fosfátovém pufru, pH 6.0) Po této inkubační periodě byly buňky pozorovány mikroskopicky za účelem zjištění senescenčních buněk anebo měření intenzity zbarvení

při 415 nm spektrofotometricky pomocí readeru Multiscam MCC (Labsystems) (positivně senescentní buňky). V těchto experimentech byly označeny pouze senescentní buňky a to díky účinku  $\beta$ -galaktosidasy na substrát.

Tabulka 6

Vliv nových sloučenin na počet senescentních buněk v kultuře lidských fibroblastů.

SUBSTITUENT	SENESCENTNÍ BUŇKY (%)		
	HCA25	HCA45	HCA80
R6			
KONTROLA	3	5	38
Kinetin	3	5	25
3-chloroanilino	4	4	27
Anilino	4	5	25
3-chloro-5-aminoanilino	4	5	23
4-bromoanilino	5	5	21
4-chloroanilino	4	6	25
3-amino-4-chloroanilino	3	5	24
2-methoxybenzylamino	4	4	16
3-methoxybenzylamino	5	6	12
2,3-dimethoxybenzylamino	4	5	18
2-methoxy-3-chlorobenzylamino	4	5	18
2-fluorobenzylamino	4	4	15
3-fluorobenzylamino	3	5	13
3-amino-4-chlorobenzylamine	4	6	22
2,3-diamino-4-chlorobenzylamine	3	4	19

Jak je ukázáno tabulce 6 se vztuštajícím počtem pasáží vrůstala hladina zabarvení po přidání substrátu pro  $\beta$ -glukosidasu. U nejstarších kultur bylo možné pozorovat pouze modře zabarvené buňky jejichž barva se nacházela v rozmezí od jasně modré po matně modrou.  $N^6$ -substituované deriváty adenosinu byly velmi účinné při zpomalování senescence buněk po 80

pasáži. V případě dlouhodobější kultivace byly schopny přežít až o 40% delší dobu oproti buňkám kontrolním.

### Příklad 7

#### 2-methylthio-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid

2-Methylthioxanthin (65 g) byl převrstven oxychloridem fosforečným (975 ml) a N,N-diethylanilinem (97.5 ml). Směs byla refluxována 1,5 h za stálého míchání. Veškerý nadbytek oxychloridu fosforečného byl odpařen pod vakuem (vakuová odparka, vodní vývěva) a zbytek smíchán s ledem (1.75 kg) v 10 l nádobě (bez dalšího chlazení). Směs byla ještě 10 min. míchána (dokončení hydrolýzy oxychloridu) a následně extrahována ethyl-acetátem (4 x 2.5 l). Spojené extrakty byly promyty vodou (3 x 1 l) a vysušeny. Surový produkt byl rekrytalizován z ethanolu a vysušen do konstantní hmotnosti nad oxidem fosforečným. Výtěžek 23.6 g (33%). UV čistota 99%. HPLC (25 x 0.4 cm ODS. Od 0 do 30% acetonitrilu. 1 ml/min. 30 min) tR 26.8 min. Čistota 92%. TLC (chloroform/methanol. 9/1) Rf 0.80

2-Methylthio-6-chloropurin (4 g, vysušen do konstantní hmotnosti nad oxidem fosforečným) byl smíchán s  $\beta$ -D-ribofuranosou 1,2,3,5-tetra acetátem (6.4 g) při teplotě 145 – 150°C v parafinové lázni. Bylo přidáno asi 100 mg jodu a směs sušena pod vodní vývěvou asi 30 min. Černý zbytek byl rozpuštěn v chloroformu, zfiltrován a nanesen ve 100ml směsi ethyl acetát/toluen (1:4) na kolonu naplněnou 2 x 400 g silikagelu ve 2 l 20% ethyl acetátu v toluenu. Kolona byla následně eluována 30% ethyl acetátem v toluenu. Složení frakcí bylo monitorováno pomocí TLC v mobilní fázi ethyl acetát/toluen 1/2 (výchozí látka Rf = 0.06, produkt 0.25). Hlavní produkt (71%),  $\beta$  isomer, byl zcela separován od  $\alpha$  isomeru a dalších nečistot. Hnědý sirup byl vysušen pod vakuem a rozpuštěn v suchém methanolu, ochlazen a deacetylován přes noc v 1000 ml bezvodého methanolu nasyceného čpavkem. Směs byla odpařena na rotační vakuové odparce a produkt byl rekrytalizován v horké vodě za vzniku žlutých krystalů a vysušen do konstantní hmotnosti nad  $P_2O_5$ . Výtěžek 4.95 g (18.6 %). B. t. 187-188 °C. HPLC čistota (25cm ODS 0 - 30% acetonitrilu) = 91%.

3.3 g (10 mmol) 2-methylthio-6-chloropurinu- $\beta$ -D-ribofuranosidu bylo přidáno do směsi 3-methylbenzylaminu v butanolu (100 ml) obsahujícího triethylamin (7.8 ml) a směs byla refluxována 2 hodiny. Butanol byl odpařen za zisku bílého produktu, který byl následně resuspendován ve vodě (50 ml). pH suspense bylo adjustováno na 8 - 8.5 pomocí 2 M NaOH a uchováváno přes noc při 4 °C. Pevný produkt byl odfiltrován a rekrytalizován z horkého

ethanolu za vzniku bílého produktu, který byl následně vysušen nad  $P_2O_5$  do konstantní hmotnosti. Výtěžek 3,1 g. (81,4%). HPLC čistota 98,6%.

Tabulka 7

Látky připravené způsobem podle příkladu 7

Substituent ( $R_2=methylthio$ )	Elementární analýza			ES-MS [ $M+H^+$ ]
	%C	%H	%A	
2-methylbenzylamino	58,9/58,2	5,3/5,6	24,5/24,8	286
3-methylbenzylamino	58,9/58,4	5,3/5,6	24,5/24,8	286
4-methylbenzylamino	58,9/58,1	5,3/5,9	24,5/25,0	286
2-methoxylbenzylamino	55,8/55,0	5,0/5,4	23,2/23,8	302
3-methoxylbenzylamino	55,8/55,5	5,0/5,1	23,2/23,3	302
4-methoxylbenzylamino	55,8/55,3	5,0/5,3	23,2/23,6	302

## Příklad 8

Indukce proteinu p21<sup>WAF-1</sup>, přirozeného inhibitory cyklin-dependentních kináz, působením cytokininů v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 – molekulární mechanismus účinku.

Změny hladiny proteinu p21<sup>WAF-1</sup> v závislosti na koncentraci 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosidu (2OH3MeOBAPR)

Na buňky MCF-7 kultivované při 37 °C v atmosféře s 5%  $CO_2$  v médiu D-MEM s přídavkem 10% fetálního telecího séra působily koncentrace 2OH3MeOBAPR v rozmezí 0-100  $\mu$ M. 2OH3MeOBAPR byl do média přidáván ze 100mM zásobního roztoku v DMSO. Po 12 hodinách byly buňky sklizeny seškrabáním do média, centrifugovány (1000rpm, 4°C, 5min), 2x promyty ledovým PBS a následně opět centrifugovány. Následovala lyze buněk 1x CSB (nanášecí pufr pro SDS-PAGE, tj. elektroforézu proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS). Proteiny v lyzátu byly separovány SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla zablokována roztokem 5% odtučněného mléka +

0.1% Tween 20 v PBS. Hladina proteinů p21<sup>WAF-1</sup> a aktin (jako kontrola nanášeného množství proteinu) byla sledována imunochemicky pomocí komerčně dostupných specifických monoklonálních protilátek Anti-WAF1 (Ab-1, Calbiochem) a Anti-Actin (Clone AC-40, Sigma-Aldrich). Pro detekci navázaných protilátek byla použita králičí sekundární protilátka značená peroxidázou (RAM-Px, DAKO) s následnou chemiluminiscencí (ECL, Amersham-Pharmacia). Účinné indukce proteinu p21<sup>WAF-1</sup> je v buňkách MCF-7 dosaženo působením koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek  $\mu$ mol na litr kultivačního média (Obr. 1).

#### Změny hladiny proteinu p21<sup>WAF-1</sup> v závislosti na době inkubace s 2OH3MeOBAPR

Buňky MCF-7 byly inkubovány v přítomnosti 1  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR. V různých časových intervalech od podání 2OH3MeOBAPR byly buňky sklizeny a lyzovány. Následná SDS-PAGE a imunodetekce umožnila stanovení změn hladiny proteinu p21<sup>WAF-1</sup> v závislosti na délce inkubace v přítomnosti 2OH3MeOBAPR. Kultivace buněk, jejich sklizení, lyze a detekce proteinů p21<sup>WAF-1</sup> a aktin v lyzátech probíhala obdobně jako v bodě 1. K účinné indukci p21<sup>WAF-1</sup> v buňkách MCF-7 dochází v rozmezí 6-24 hodin po případku 2OH3MeOBAPR v 1  $\mu$ M koncentraci (Obr.2).

#### Příklad 9

##### *In vitro* cytotoxická aktivita nových derivátů

Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test je využíván v programech pro screening léků a pro testy chemosensitivity. Testem se rozpoznají pouze životaschopné buňky. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných buněk v kultuře.

Lidská T-lymfoblastická leukemická buněčná linie CEM, promyelocytární HL-60 a monocytární U937 leukemie, buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, buňky cervikálního karcinomu HEA, myši fibroblasty NIH3T3, lidská erythroleukemie K562, buňky G361 lidského maligního melanomu byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80  $\text{cm}^2$  plastikových lahvích a pěstovány v mediu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5g/l glukózy, 2mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100  $\mu$ g/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný), sloučeniny byly připraveny postupem podle předloženého vynálezu.

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk ( $10^4$  buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), pipetovalo se 80  $\mu$ l buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub>. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20  $\mu$ l alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny řídily do šesti koncentrací v čtyřnásobné řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166.7  $\mu$ M, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v dubletu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100 % vlhkosti a v atmosféře CO<sub>2</sub>. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluoroskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (The tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu:  $GI_{50} = (FD_{jamka\ s\ derivátem} / FD_{kontrolní\ jamka}) \times 100\%$ . Hodnota GI<sub>50</sub>, která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (Obr. 3).

Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 8). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin, kdežto nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Účinné deriváty zabily nádorové buňky při koncentracích blízkých 0.1-50  $\mu$ M.

Tabulka 8

Cytotoxicita N<sup>6</sup>-substituovaných derivátů adenosinu pro různé nádorové buňky

Substituent v poloze N <sup>6</sup> -adenosinu	Použitá buněčná linie / IC 50 ( $\mu$ mol/L)						
	HOS	K-562	MCF7	NIH-3T3	G-361	CEM	HL60
Adenosin	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
ZR	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
2-hydroxybenzylamino	2.8	88	11.4	43.2	>166,7	0.7	0.42
3-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	51.9	23.7
4-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	39.7	9.5
2-methoxybenzylamino	21.2	11.2	>166,7	>166,7	>166,7	3.2	2.3

3-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	7.6	4.9
4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	114.9	>166,7	>166,7
2-chlorobenzylamino	>166,7	64	>166,7	>166,7		14.5	1.6
3-chlorobenzylamino	>166,7	30.4	>166,7	>166,7		1.6	0.75
4-chlorobenzylamino	>166,7	16.1	>166,7	>166,7		6.5	5.3
2-fluorobenzylamino	>166,7	33.2	>166,7			4.6	3.2
3-fluorobenzylamino	>166,7	7	16.6	>166,7	15.7	4	0.92
4-fluorobenzylamino	20	6.4	14	>166,7		1.5	0.86
2-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		14	3.3
3-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		19.1	6.4
4-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	>166,7
2-bromobenzylamino	>166,7	10	>166,7	>166,7		12.3	6.6
3-bromobenzylamino	>166,7	19.7	>166,7	>166,7		5	8
4-bromobenzylamino	>166,7	68.2	>166,7	>166,7		20.6	47.4
2,4-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	39
2-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	11.7	>166,7	>166,7		20.9	9
3-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	4.1	>166,7	>166,7		3.4	3.5
2,3-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	109
2,4-dichloroxybenzylamino	>166,7	85.7	126.9	>166,7		86.7	96.3
2,4-difluororoxbenzylamino	>166,7	7.4	>166,7	>166,7		7.1	3.4
2,3,4-trifluororoxbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		58.2	13
3,4-dichloroxybenzylamino	>166,7	6.5	88.8	>166,7		3	1.1
3,5-difluororoxbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		24.5	9.1
3,5-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			18.8
2,3,6-trifluororoxbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			13
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	>166,7	19.2	27	>166,7	148.1	0.3	0.15
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	>166,7
2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	>166,7	15.4	21	>166,7	102.3	0.2	0.1
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	>166,7	10.7	15	>166,7	128.5	0.3	0.1
R2=Cl, Substituent v N <sup>6</sup> -poloze							
2-hydroxybenzylamino	2.5	75	10.5	35.1	>166,7	0.56	0.38
3-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	47.8	15.9
4-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	39.7	9.5
2-methoxybenzylamino	15.3	14.5	>166,7	>166,7	>166,7	2.7	1.5
3-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	6.5	4.1
4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	105.4	>166,7	>166,7
2-chlorobenzylamino	>166,7	61	>166,7	>166,7		8.5	1.2
3-chlorobenzylamino	>166,7	28	>166,7	>166,7		1.1	0.6
4-chlorobenzylamino	>166,7	15	>166,7	>166,7		5.8	5.0

2-fluorobenzylamino	>166,7	30	>166,7			4.2	2.5
3-fluorobenzylamino	>166,7	5.3	16	>166,7	16	3	0.9
4-fluorobenzylamino	19	5.8	12	>166,7		1.5	0.7
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	>166,7	17	23	>166,7	140	0.2	0.1
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	>166,7	10	14	>166,7	118	0.2	0.1
R2=NH <sub>2</sub> , Substituent v N <sup>6</sup> -poloze							
2-methoxyxybenzylamino	27.8	34.9	>166,7	>166,7	>166,7	12.8	7.8
3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	13.8	8.9
2-chlorobenzylamino	>166,7	78	>166,7	>166,7		24.7	10.3
3-chlorobenzylamino	>166,7	43	>166,7	>166,7		10.2	5.8
2-fluorobenzylamino	>166,7	45	>166,7			14.5	8.7
3-fluorobenzylamino	>166,7	12	36	>166,7	21	21	3.4
4-fluorobenzylamino		43	13	25	>166,7		12.1
R2=SCH <sub>3</sub> , Substituent v N <sup>6</sup> -poloze							
2-methoxyxybenzylamino	34.3	34.8	>166,7	>166,7	>166,7	11.5	10.2
3-methoxyxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	16.5	8.8
2-chlorobenzylamino	>166,7	78	>166,7	>166,7		14.6	7.4
3-chlorobenzylamino	>166,7	35	>166,7	>166,7		13.2	6.1
2-fluorobenzylamino	>166,7	42	>166,7			9.7	11.4
3-fluorobenzylamino	>166,7	7.9	31	>166,7	28	8.5	5.2

### Příklad 10

Nové sloučeniny indukuji apoptózu nádorových buněk

Pro analýzu mechanizmu indukované cytotoxicity nových sloučenin je důležité odlišit apoptózu od druhé hlavní formy buněčné smrti, nekrózy. Zaprvé, na úrovni tkáně apoptóza produkuje malý nebo žádný zánět, protože okolní buňky, zvláště makrofágy, spíše než že jsou uvolněny do extracelulární tekutiny, pohltí jednotlivé části buňky. Naproti tomu při nekróze je buněčný obsah uvolněn do extracelulární tekutiny, což způsobuje zánět. Zadruhé, na buněčné úrovni vykazují apoptoické buňky smršťování a blebbing (puchýřkování) cytoplasmy, zachování struktury buněčných organel včetně mitochondrií, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jádra a tvorbu apoptoických tělisek, ačkoli ne všechny jsou vidět u všech typů buněk. Zatřetí, na molekulární úrovni hraje významnou roli v indukci apoptózy řada biochemických procesů. Většina z nich však není dobře pochopena a mají za následek aktivaci proteáz a nukleáz, které nakonec ničí klíčové biologické makromolekuly - proteiny a DNA.

*Kultivace buněk.* Suspenze lidských leukemických buněk, linie HL-60 byla kultivována v médiu RPMI-1640 doplněném 10% telecím fetálním sérem a antibiotiky v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C. Počet buněk je stanoven pomocí hemocytometru. Buňky byly získány z ECACC.

*Viabilita buněk.* Buňky jsou barveny kombinací fluorescein diacetátu (FDA, 2 µg/ml) a propidium jodidu (PI, 10 µg/ml) přímo v růstovém médiu. Rozlišování živých a mrtvých buněk se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu (Mlejnek and Kolman. *Chem. Biol. Interact.* 1999, 117: 219-239 ).

*Morfologická analýza buněčných jader.* Buňky jsou promyty v PBS a pak fixovány ve směsi methanol/kyselina octová (3:1) při -20 °C po dobu 12 hodin. Fixované buňky jsou nakapány na podložní sklíčka a barveny Hoechst 33342 (2 µg/ml) v PBS/glycerol (v/v 70:30). Morfologie buněčných jader je pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60, (Mlejnek and Kuglik 2000).

*Analýza buněčného cyklu.* Buňky jsou promyty v PBS a pak fixovány v 70% etanolu při -20°C přes noc. Fixované buňky jsou promyty v PBS, a pak barveny v roztoku PBS obsahujícího propidium jodid PI (20 µg/ml) a RNase A (100 µg/ml) po dobu 30 min při teplotě místnosti. Obarvené buňky jsou dále analyzovány průtokovou cytometrií (FACScan, Becton Dickinson), (Mlejnek and Kolman 1999).

*Měření integrity jaderné DNA.* Vzorky buněk jsou promyty v PBS a pak lyzovány v pufru (50 mM Tris/ HCl, pH = 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% sarkosinátu sodném, 0.5 mg/ml proteinázy K a 0.2 mg/ml RNáza A) po dobu 12 hodin při 37 °C. DNA extrakty jsou pak analyzovány standardní agarózovou elektroforézou (Mlejnek, and Kuglik. *J. Cell. Biochem.* 2000, 77: 6-17).

*Měření obsahu nukleotidů pomocí HPLC.* Asi 10<sup>7</sup> buněk je sedimentováno centrifugací (2500 ot/min, 3 min. při lab. teplotě). Sedimenty jsou extrahovány 5% HClO<sub>4</sub> po dobu 15 min. při 4°C. Buněčné extrakty jsou neutralizovány přídavkem 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Alikvoty extraktů jsou naneseny na kolonu µBONDAPAK C<sub>18</sub> (250 x 4 mm, 5 µm) a nukleotidy jsou eluovány za izokratických podmínek: mobilní fáze - 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=6.4, 5mM tetrabutylamonium phosphate + 10% acetonitril, průtok - 0.4 ml/min. Kvantitativní analýza byla provedena pomocí externího standardu ATP, iPA a iPA monofosfátu (Mlejnek, and Kuglik. *J. Cell. Biochem.* 2000, 77: 6-17).

*Měření aktivit kaspázových proteáz.* Buňky jsou promyty v PBS a pak lyzovány

v kaspázovém extrakčním pufru [50 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% Chaps, 5 mM dithiothreitol, a směs inhibitorů proteáz (Roche)] po dobu 15 min. při 4 °C. Lyzáty jsou odstředěny (30 000 × g při 4 °C po dobu 30 min.). Supernatant je možno ihned použít pro měření nebo uschovat při -80 °C. Měření aktivit se provádí se syntetickými fluorescenčními substráty. Aktivita kaspázy-1, a 3 byly měřeny se substráty Ac-YVAD-AMC a Ac-DEVD-AMC při 380/445 nm v reakčním pufru (25 mM PIPES/KOH, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5 mM DTT, pH 7.3). Aktivita kaspázy-9 pak se substrátem Ac-LEHD-AFC při 400/500 nm ve stejném reakčním pufru, avšak při pH = 6.6 (Mlejnek. J. Cell. Biochem. 2001, 83: 678-689 ).

### Výsledky

6-(2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino-purin ribosid (2OH3MeOBAPR) a další příbuzné cytokininové deriváty zpomaluje buněčnou proliferaci (Obr. 4) a indukuje buněčnou smrt u buněk HL-60, jež nese typické morfologické a biochemické znaky apoptozy (Obr. 5-7). Analýza buněčného cyklu ukazuje, že 2OH3MeOBAPR neinhibuje buněčný cyklus v některém z kontrolních bodů, ale více méně nespecificky (Obr. 8). Působení 2OH3MeOBAPR indukuje aktivaci kaspázových proteáz, zejména kaspázu-9 a -3 (Obr. 9). Inhibici kaspázových proteáz nelze zabránit buněčné smrti. Nespecifický kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK potlačuje morfologické i biochemické apoptotické znaky, avšak neinhibuje buněčnou smrt jako takovou (Obr. 10). 2OH3MeOBAPR není toxicke pro buňky sám o sobě, toxicke jsou pouze jeho fosforylované deriváty. Inhibitory adenosin kinázy, které zabrání intracelulární konverzi 2OH3MeOBAPR na 2OH3MeOBAPR monofosfát úplně potlačí nástup apoptozy včetně všech jejich morfologických i biochemických znaků (Obr. 11).

### Příklad 11

#### Imunosupresivní aktivita

Jedním z důležitých parametrů specifické buněčné imunity je odezva lymfocytů na antigeny nebo polyklonalní mitogeny. Většina normálních savčích periferních lymfocytů je v klidové fázi buněčného cyklu. Antigeny i nespecifické polyklonalní mitogeny mají schopnost aktivovat lymfatické buňky, což je doprovázeno dramatickými změnami ve vnitrobuněčném metabolismu (mitochondriální aktivita, proteinová syntéza, syntéza nukleových kyselin, formování blastů a buněčná proliferace). Sloučeniny, které jsou schopné selektivně inhibovat proliferaci lymfocytů, jsou potenciálními imunosupresivy. Pro měření proliferační odpovědi

lymfocytů bylo vyvinuto množství *in vitro* analýz. Nejběžněji používanou metodou je inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu.

Během buněčné proliferace dochází nejprve k replikaci DNA, poté je buňka rozdělena na dvě dceřinné buňky. Tento úzký vztah mezi buněčným zdvojením a DNA syntézou poskytuje možnost pro vyhodnocení intenzity buněčné proliferace. Jestliže jsou značené DNA prekuryzory přidány do buněčné kultury, dělící se buňky inkorporují značené nukleotidy do své DNA. Tyto testy obvykle vyžadují použití radioaktivně značených nukleotidů, konkrétně tritiovaný thymidin ( [ $^3\text{H}$ ]-TdR). Množství [ $^3\text{H}$ ]-TdR inkorporované do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítače.

Lidská heparinizovaná periferní krev byla získaná od zdravých dobrovolníků punkcí z kubitální žíly. Krev byla naředěna v PBS (1:3) a mononukleární buňky byly odseparovány centrifugací ve Ficoll-Hypaque hustotním gradientu (Pharmacia, 1.077 g/ml) při 2200 g po dobu 30 minut. Při následující centrifugaci byly lymfocyty promývány v PBS, poté resuspendovány v buněčném kultivačním mediu (RPMI 1640, 2mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 10 % fetální telecí sérum a hydrogenuhličitan sodný).

Buňky byly naředěny na cílovou hustotu 1.100.000 buněk/ml a byly pipetovány (180 µl) do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Testované látky byly přidány k buněčným suspenzím ve čtyřkovém ředění v 20 µl alikvotech/jamku v čase nula. Obvykle byly testované sloučeniny vyhodnocovány v šesti koncentracích s nejvyšší testovanou koncentrací 266.7 µM. Jednotlivé koncentrace derivátů byly testovány v dubletu. Lymfocyty ve všech jamkách s výjimkou nestimulovaných kontrol byly aktivovány přidáním 50 µl konkanavalinu A (25 µg/ml). Buněčné suspenze byly dále inkubovány 72 hodin při 37 °C a při 100 % vlhkosti v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Na konci inkubace byly buňky analyzovány pomocí [ $^3\text{H}$ ]-TdR:

Buňky byly inkubovány s 0.5 µCi (20 µl zásobního roztoku 500 µCi/ml) na jamku po dobu 6 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. V dalším kroku byl použit automatizovaný buněčný harvester pro lýzu buněk ve vodě a adsorpci DNA na filtr ze skleněných vláken o velikosti mikrotitračního panelu. DNA s inkorporovaným [ $^3\text{H}$ ]-TdR je zadržena na filtru, přičemž neinkorporovaný materiál filtrem prochází. Filtry byly usušeny při teplotě místnosti přes noc, uzavřeny v plastikových sáčcích s 10-12 ml scintilační tekutiny. Množství [ $^3\text{H}$ ]-TdR přítomné na každém filtru bylo stanoveno scintilačním počítači. Efektivní imunosupresivní dávka (ED) byla spočítána podle následujícího vzorce: ED = (CCPM<sub>jamka s test. derivátem</sub> / průměrná CCPM<sub>kontrolní jamka</sub>) × 100 %. Hodnota ED<sub>50</sub>, což je koncentrace látky inhibující proliferaci 50 % lymfocytů, byla spočítána z dávkových křivek.

Pro vyhodnocení imunosupresivní aktivity nových sloučenin byla analyzována jejich schopnost inhibovat polyklonálním mitogenem stimulovanou proliferaci normálních lidských lymfocytů (Tab. 9). Uvedené výsledky ukazují, že tyto sloučeniny mají minimální vliv na inkorporaci  $^3\text{H}$ -thymidinu v klidových (nestimulovaných) lymfocytech, nicméně účinně inhibují proliferaci mitogenem aktivovaných lymfocytů. Efektivní imunosupresivní dávka nových derivátů za *in vitro* podmínek byla v rozmezí 10-40  $\mu\text{M}$ .

Tabulka 9  
Imunosupresivní aktivity nových sloučenin

SUBSTITUENT V POLOZE N <sup>6</sup> ADENOSINU	Lidské lymphocyty ED <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
2-hydroxybenzylamino	4.8
3-hydroxybenzylamino	10.7
2-fluorobenzylamino	5.6
3-fluorobenzylamino	7.1
4-fluorobenzylamino	9.4
2-methylbenzylamino	5.8
3-methylbenzylamino	6.5
3,4-dihydroxybenzylamino	8.3
2-hydroxy-3-chlorobenzylamino	2.1
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	1.4
2-hydroxy-4-methoxybenzylamino	1.5
2-chlorobenzylamino	8.4
3-chlorobenzylamino	2.5
4-chlorobenzylamino	3.9

#### Příklad 12

Antisenescenční aktivity nových látek při testování v senescenčním biotestu na segmentech listů pšenice

Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byly promyty pod tekoucí vodou po 24 hod. a poté vysety do vermiculity nasyceného Knopovým živným roztokem.

Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita  $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a teplotou  $15^\circ\text{C}$ . Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 5 rostlin byly odebrány vrcholové sekce dlouhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 5 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrenových destiček obsahujících 150 ml roztoku testovaného derivátu. Destičky byly umístěny do plastického boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při  $25^\circ\text{C}$  byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80% ethanolu zahřátím při  $80^\circ\text{C}$  po dobu 10 min. Objem vzorku byl poté doplněn na 5 ml přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 5 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2-krát. Výsledky těchto experimentů byly vyneseny ve formě grafů zavislosti obsahu chlorofylu v senescenčních listech v závislosti na koncentraci (viz Obr. 12). V každém experimentu byla použita jako kontrolní látky 6-benzylaminopurin ribosid, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokinininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na  $10^{-3} \text{ M}$ . Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu  $10^{-8}$  až  $10^{-4} \text{ M}$ . Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevyšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat (obr. 12) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 10).  $10^{-4} \text{ M}$  koncentrace BAPR byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 10

Účinek nových cytokinů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Hodnoty v tabulce jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací.

Substituent N6	Maximální účinná koncentrace ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	účinnost (%) [ $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ BAP = 100%]

2-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	118±19
3-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	220±16
4-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	148±2
2-chlorobenzylamino	$10^{-4}$	119±9
3-chlorobenzylamino	$10^{-4}$	72±8
4-chlorobenzylamino	$10^{-4}$	104±6
2-bromobenzylamino	$10^{-5}$	86±19
3-bromobenzylamino	$10^{-4}$	89±10
4-bromobenzylamino	$10^{-4}$	76±11
3-jodobenzylamino	$10^{-4}$	98±4
2-methylbenzylamino	$10^{-4}$	142±6
3-methylbenzylamino	$10^{-4}$	143±9
4-methylbenzylamino	$10^{-4}$	55±5
2-methoxylbenzylamino	$10^{-4}$	198±12
3-methoxylbenzylamino	$10^{-4}$	209±8
4-methoxylbenzylamino	$10^{-4}$	110±9
2,4-dichlorobenzylamino	$10^{-5}$	5±1
3,4-dichlorobenzylamino	$10^{-4}$	151±29
2,3-dimethoxylbenzylamino	$10^{-4}$	106±17
3,4-dimethoxylbenzylamino	$10^{-4}$	47±6
3-chloro-4-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	156±10
3,5-difluorobenzylamino	$10^{-4}$	195±14
2,4-difluorobenzylamino	$10^{-4}$	171±8
2,3,4-trifluorobenzylamino	$10^{-4}$	144±12
2,3,6-trifluorobenzylamino	$10^{-4}$	133±14
2-hydroxy-3-methoxylbenzylamino	$10^{-4}$	30±8
3-hydroxy-4-methoxylbenzylamino	$10^{-4}$	22±5

Vyvinuté látky mají velmi silné antisenescenční účinky. Některé z nich vyvolávají až 200% nárůst obsahu chlorofylu v extirpovaných listech pšenice oproti kontrole.

## Příklad 13

## Stimulační vliv nových látek na buněčné dělení rostlinných buněk

Stimulační vliv nově připravených derivátů byl testován v kalusovém biotestu za použití cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Tento cytokinin-dependentní tabákový kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 byl udržován při 25 °C na modifikovaném mediu Murashige-Skoog obsahujícím na 1 litr: 4 µmol kys. nikotinové, 2.4 µmol pyridoxin hydrochloridu, 1.2 µmol thiaminu, 26.6 µmol glycinu, 1.37 µmol glutaminu, 1.8 µmol myoinositolu, 30 g sacharosy, 8 g agaru, 5.37 µmol  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny a 0.5 µmol 6-benzylaminopurinu. Subkultivace probíhala každé 3 týdny. Čtrnáct dní před započetím biotestu byl kalus přenesen na médium bez 6-benzylaminopurin ribosidu. Stimulační růstová aktivita byla stanovena na základě nárstu čerstvé hmoty kalusu po 4 týdnech kultivace. Pět replikátu bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látky 6-benzylaminopurin ribosidu, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpouštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na  $10^{-3}$  M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu  $10^{-8}$  až  $10^{-4}$  M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevyšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Stimulační aktivita byla vypočtena z růstových křivek závislosti čerstvé hmoty kalusu na koncentraci, jejichž příklady jsou znázorněny na obr. 6.

Ze získaných dat (obr. 13) byla opět vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 11).  $10^{-6}$  M koncentrace BAP byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 11

Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního tabákového kalusu *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

Substituent N6	maximální účinná koncentrace ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	účinnost (%) [ $10^{-5}\text{ mol.l}^{-1}$ BAP = 100%]
2-fluorobenzylamino	$10^{-6}$	100±9

3-fluorobenzylamino	$10^{-5}$	91±6
4-fluorobenzylamino	$10^{-6}$	100±6
2-chlorobenzylamino	$10^{-6}$	93±4
3-chlorobenzylamino	$10^{-5}$	96±5
4-chlorobenzylamino	$10^{-6}$	46±14
2-bromobenzylamino	$10^{-5}$	100±4
3-bromobenzylamino	$10^{-6}$	82±11
4-bromobenzylamino	$10^{-6}$	15±11
3-jodobenzylamino	$10^{-6}$	47±12
2-methylbenzylamino	$10^{-6}$	98±4
3-methylbenzylamino	$10^{-6}$	90±2
4-methylbenzylamino	$10^{-6}$	95±6
2-methoxylbenzylamino	$10^{-5}$	108±1
3-methoxylbenzylamino	$10^{-6}$	92±1
4-methoxylbenzylamino	$10^{-6}$	2±2
2,3-dimethoxylbenzylamino	$10^{-6}$	5±2
3-chloro-4-fluorobenzylamino	$10^{-6}$	87±4
2-chloro-4-fluorobenzylamino	$10^{-5}$	98±4
3,5-difluorobenzylamino	$10^{-6}$	95±3
2,3,6-trifluorobenzylamino	$10^{-5}$	92±2
2,4,5-trifluorobenzylamino	$10^{-5}$	95±3

#### Příklad 14

##### Testování nových cytokininů v amarantovém biotestu

Pro studium cytokininové aktivity byl rovněž použit "amarantový" biotest (Biddington a Thomas, *Planta* 11:183-186, 1973) v následující modifikaci. Semena *Amaranthus caudatus* var. *Atropurpurea* byla povrchově sterilizována 10% N-chlorobenzensulfoamidem (w/v) po dobu 10 min a poté promyta 5-krát deionizovanou vodou. Semena byla rozmištěna v 15 cm Pertriho miskách s filtračním papírem saturovaným destilovanou vodou. Po 72 hodinách kultivace při 25 °C ve tmě byly ze semenáčků odstraněny kořeny. Tyto explantáty obsahující 2

kotyledony a hypokotyl byly umístěny do 5 cm Petriho misku on 2 vrstvy filtračního papíru nasyceného 1 ml inkubačního média obsahujícího 10  $\mu\text{mol}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8, 5  $\mu\text{mol}$  tyrosinu a testovaný cytokinin. Na misku bylo umístěno 20 explantátů. Veškeré manipulace byly prováděny pod zeleným světlem v temné komoře. Po 48 hodinách inkubace při 25 °C ve tmě byl betacyanin extrahován cestou zmražení explantátů v 3,33  $\mu\text{M}$  kyselině octové. Koncentrace betacyaninu byla stanovena porovnáním absorbancí při 537 a 620 nm a vypočtena pomocí vzorce  $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$ . Hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti  $\Delta A$  na koncentraci (Obr.7). Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látky 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na  $10^{-3}$  M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu  $10^{-8}$  až  $10^{-4}$  M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat (obr. 14) byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 12).  $10^{-4}$  M koncentrace BAP byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Tabulka 12

Vliv nových cytokininů na obsah betacyaninu v explantátech kotyledonů/hypokotylů  
*Amaranthus caudatus*.

	Substituent N6	Maximální účinná koncentrace ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	účinnost (%) [ $10^{-5}\text{mol.l}^{-1}$ BAP = 100%]
1.	2-fluorbenzylamino	$10^{-4}$	96±2
2.	3-fluorbenzylamino	$10^{-4}$	92±6
3.	4-fluorbenzylamino	$10^{-5}$	71±4
4.	2-chlorbenzylamino	$10^{-5}$	113±7
5.	3-chlorbenzylamino	$10^{-5}$	139±12
6.	4-chlorbenzylamino	$10^{-5}$	35±9

7.	2-brombenzylamino	$10^{-4}$	147±7
8.	3-brombenzylamino	$10^{-4}$	151±16
9.	4-brombenzylamino	$10^{-5}$	30±8
10.	3-jodbenzylamino	$10^{-5}$	102±18
11.	2-methylbenzylamino	$10^{-5}$	105±14
12.	3-methylbenzylamino	$10^{-5}$	103±16
13.	4-methylbenzylamino	$10^{-5}$	32±7
14.	2-methoxybenzylamino	$10^{-5}$	86±4
15.	3-methoxybenzylamino	$10^{-4}$	98±10
16.	4-methoxybenzylamino	$10^{-4}$	17±8
17.	3-nitrobenzylamino	$10^{-4}$	66±7
18.	4-nitrobenzylamino	$10^{-4}$	25±3
19.	2,4-dichlorbenzylamino	$10^{-4}$	3±2
20.	3,4-dichlorbenzylamino	$10^{-4}$	68±10
21.	2,3-dimethoxybenzylamino	$10^{-4}$	21±7
22.	2,4-dimethoxybenzylamino	$10^{-5}$	3±3
23.	3,4-dimethoxybenzylamino	$10^{-4}$	2±1
24.	3,4-dihydroxybenzylamino	$10^{-4}$	8±3
25.	2,4-difluorobenzylamino	$10^{-4}$	88±7
26.	3,5-difluorobenzylamino	$10^{-4}$	88±1
27.	2,3,6-trifluorobenzylamino	$10^{-4}$	94±1
28.	3-chloro-4-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	82±5
29.	2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	$10^{-4}$	18±5
30.	3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	$10^{-4}$	0
31.	2-chloro-4-fluorobenzylamino	$10^{-4}$	115±1
32.	2,4,5-trifluorobenzylamino	$10^{-4}$	120±1

## Příklad 15

Účinky testovaných látek na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořenování růže (*Rosa multiflora*).

Úlohou tohoto experimentu bylo otestovat zda nové látky jsou prakticky využitelné v tkáňových kulturách. Byl studován index množení a *post vitro* účinky. Růže (*Rosa hybrida*) byly pěstovány v 350 ml nádobách se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100ml autoklávovaného kultivačního media (120 °C, 20 min.). Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 ± 2 °C a světelné periodě 16 hodin při 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Základní medium (MBR) obsahovalo makro-, mikro-prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 95  $\mu\text{M}$  NaFeEDTA, 555  $\mu\text{M}$  myo-inositolu, 111 mM sacharosy, 1.332 mM glycinu, 684  $\mu\text{M}$  L-glutaminu and 7g/l agaru. Toto medium bylo doplněno 10  $\mu\text{M}$  testované látky. 6-Benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní medium neobsahovalo žádný cytokinin. Po uplynutí 8 týdnů byl stanoven přírůstek nových prýtů na jeden explantát, stejně jako počet kořenů na jeden explantát a celková délka kořenů na jeden explantát. Po odstranění kořenů byly explantáty (skupiny prýtů) přeneseny do rašeliny. Po čtyřech týdnech aklimatizace byl znova stanoven počet kořenů a jejich celková délka na jeden explantát.

Podle předpokladu, rostliny pěstované na mediu neobsahujícím cytokininy neměly téměř žádné nové prýty. Původní explantáty vyrostly v kvalitní jednotlivé výhony, velmi dobře zakořeňující (Tab.13). Explantáty rostoucí na BAP se vyznačovaly vysokým indexem množení (velkým množstvím nových prýtů) a velmi špatným zakořeňováním (Tab. 13). Všechny testované nové látky, deriváty BAP, indukovaly tvorbu nových výhonů a zakořeňovaly výrazně lépe než BAP (Tab.13).

Tabulka 13

Účinek testovaných látek, cytokininů, na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*).

Substituent	In vitro				Ex vitro	
	Počet nových prýtů na jeden explantát	Počet květů na jeden explantát	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)	Počet kořenů na jeden explantát	Celková délka kořene na jeden explantát (cm)
Kontrola	0.2	0.03	0.8	1.2	4.6	17.1
BAP*	3.8	0.00	0.0	0.0	0.6	1.1
2-methoxybenzylamino	1.4	0.17	0.0	0.0	1.6	4.8
3-methoxybenzylamino	5.6	0.00	0.0	0.0	1.4	3.5

\* BAP = 6-benzylaminopurin

### Příklad 16

#### Inhibice senescence *in vitro* pěstovaných explantátů *Rosa hybrida*.

Problémem tkáňových kultur růží jsou časté příznaky senescence explantátů. Listy začínají hnědnout a po několika týdnech všechny explantáty v nádobě hynou. Symptomy nastupují dříve, jestliže je nádoba vzduchotěsně uzavřena, například plastikovou folií. To ukazuje na důležitou úlohu ethylenu v tomto procesu. Cytokininy aplikované do kultivačního media indukují tvorbu ethylenu, je proto užitečné testovat nové látky cytokininové povahy také v tomto systému.

Růže *Rosa hybrida* 'Pailin' byla pěstována v 350 ml nádob se šroubovacím polykarbonátovým uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100 ml autoklávovaného kultivačního media (120 °C, 20 min.). Rostliny byly kultivovány při teplotě 23 ± 2 °C a světelné periodě 16 hodin při 40  $\mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PAR. Základní medium (MBR) obsahovalo makro-, mikro-prvky a vitamíny podle Murashigeho a Skooga (1962), 36.7 mg/l NaFeEDTA, 50 mg/l NaFeEDDHA, 100 mg/l  $\mu\text{M}$  myo-inositolu, 30 g/l sacharosy, 100 mg/l glycinu, 50 mg/l calcium pantothenatu, 100 mg/l L-glutaminu a 7 g/l agaru. Toto medium bylo doplněno 10  $\mu\text{M}$  testované látky. 6-benzylaminopurin (BAP) byl používán jako standard, kontrolní medium neobsahovalo žádný cytokinin. Příznaky stárnutí explantátů byly studovány po šesti týdnech kultivace (obr. 17). Bylo zaznamenáváno objevení prvního hnědého listu a den úhynu celého explantátu.

Výsledky jsou ukázány na obr. 15 a 16. Relativní počet uhynulých explantátů na mediu s BAP odpovídá sigmoidní křivce, což naznačuje že jeho vliv na senescenci je zesílen autokatalýzou, pravděpodobně ethylenem. Při použití medií s 6-(3-hydroxybenzylamino)purinem (mT) a 6-(3-methoxybenzylamino)purinem ribosidem (3MeOBAPR) byla situace výrazně lepší (obr. 8). Nejlepší testovanou látkou byl bezesporu 3MeOBAPR; ještě 121 den kultivace byly živé téměř všechny explantáty. I když ani na mediu s 3MeOBAPR nebylo možné zabránit zhnědnutí některých listů, tyto rostliny mohou být přesto bez problémů použity pro další subkultivaci. Užití 3MeOBAPR je statisticky významným vylepšením při mikropopagaci *Rosa hybrida*.

### Příklad 17

#### Polní pokusy – ošetření porostů pšenice jarní testovanými látkami

Porosty (v posledních 4 letech) pšenice jarní jsou vysévány v řepařském výrobním typu na pokusném pozemku České zemědělské univerzity (ČZU) výsevkem 400 klíčivých zrn na

1 m<sup>2</sup> do naorané a uválené zeminy obsahující podle agrochemických rozborů provedených na Katedře pedologie ČZU 116,1 mg/kg P, 228,3 mg/kg K, a 211,8 mg/kg Mg. Odstup orby a setí zpravidla 3-4 dny, jen za nepříznivého počasí větší. Předplodinou je řepka. Příprava půdy se dělá klasicky smykem a branami po zasetí se válí. Charakter ročníků, průměrné měsíční teploty a srážky jsou v tabulce 14.

Tabulka 14

Charakteristika ročníků-teplotní průměr a srážkový úhrn v zájmové oblasti

Ročník	1997		1998		1999		2000		2001	
	teploty	srážky								
Leden	-3,2	20,3	2,2	8,37	0,64	8,7	-1,5	22	1,8	22,3
Únor	3,3	18,7	5	12,8	3,47	18,9	3,1	22	-2,3	31,9
Březen	6,8	23,7	5,4	18,4	3,24	30,6	3,9	26	3,2	11,9
Duben	9,7	29,3	4,6	15	9,88	11,7	10,5	41	10,6	16,5
Květen	8,7	15,2	11,4	5,2	13,6	25,4	15,4	54	16,3	66,1
Červen	12,3	70,5	15,4	37	16,7	101,2	17,5	63	16,6	97,7
Červenec	17,1	108,9	18,5	79,8	17,4	67,4	15,8	69	17,1	102,3
SRpen	18,7	60,5	19,7	58,4	17,8	22,5	18,8	64	17,6	56,7
Září	13	41,5	13,8	67,1	15,2	68,8	13,7	42	11,5	68
Říjen	6,5	34,1	9,6	37,4	8,54	86,4	10,6	35	8,3	48,6
Listopad	2,7	28,2	5,7	41,2	0,54	23,4	2,5	29	1	50,2
Prosinec	1,2	46,1	2,4	27,8	-0,55	8,1	0,4	26	3,6	33,9
Průměr	8,07		9,5		8,9		9,2		8,8	
úhrn		497		408,47		473,1		471		606,1

Charakteristika počasí ve vegetační sezóně

Ročník	1997		1998		1999		2000		2001	
	teploty	srážky								
Duben	9,7	29,3	4,6	15	9,88	11,7	10,5	41	10,6	16,5
Květen	8,7	15,2	11,4	5,2	13,6	25,4	15,4	54	16,3	66,1
Červen	12,3	70,5	15,4	37	16,7	101,2	17,5	63	16,6	97,7
Červenec	17,1	108,9	18,5	79,8	17,4	67,4	15,8	69	17,1	102,3
průměr	12		12,5		14,4		14,8		8,8	
úhrn		223,9		137		205,7		227		282,6

Od vzejití v 14 denních intervalech jsou sledovány délky rostlin, listová plocha, sušina, vývin vegetačního vrcholu - základu budoucího klasu, a počet odnoží, po ošetření i obsah chlorofylu v listech. Z těchto primárních údajů se počítají hodnoty, obvyklé v produkční fyziologii například pokryvnost listoví LAI, fotosyntetický potenciál LAD, odnožovací potenciál OP. Pokusy s ošetřením porostů pšenice jarní Sandry na poli v maloparcelkách (velikost 10 m<sup>2</sup> n=4 opakování) se dělají postříkem látek (cytokininů) dávkou 1 litr roztoku o koncentraci 1mol.10<sup>-6</sup> v přechodu fází sloupkování-metání (49 DC). Navázka dodaného přípravku z laboratoře se

rozpouští v horké destilované vodě v objemu 1 litr. Poté se objem doplní na dvojnásobek a aplikuje na  $4 \times 10 \text{ m}^2$ , protože aplikace objemu 1 litru roztoku na ploše  $40 \text{ m}^2$  je technicky v polních podmírkách na již poměrně vzrostlý, vyspělý porost, neproveditelná.

Po aplikaci se během 6 dní od ošetření stanovuje aktivita enzymu glutamátkinasy. Tento enzym byl vybrán protože z jeho změn lze soudit na optimalizaci pohybu látek (živin z kořenů, asimilátů od zdrojů vzniku do sinku, obecně do zásobních orgánů, v případě obilnin do obilek), na respiraci, přenosy energie-adenosintrifosfátu, ukládání látek, a procesy růstu a vývinu, i na metabolismus prolinu, o němž je z literatury známo, že hraje významnou roli v adaptačních reakcích vůči stresu (nevhodné stanoviště, sucho, zasolení, chlad aj.), i v regulaci potenciální a reálné produktivity (omezení redukce počtu založených zrn v klasu). Enzym glutamátkinasa, katalyzuje přeměnu glutamátu na  $\gamma$  glutamylfosfát, což je první chemická reakce při syntéze prolinu z glutamátu. Tak je enzym glutamátkinasa jako nezbytný prekursor dalších metabolických pochodů v rostlině i ukazatelem inhibice stresu. Stanovuje se spektrofotometricky obměnou hydroxamátové metody dle Vašákové (1980). K analýze se připravují standartní metodou acetonové prášky, které se vyextrahují 0,05 mol/l draselnofosfátovým pufrem pH=7,2 a odstředí. Tak se získají supernatanty z nichž se krystalickým síranem amonným vysolí frakce glutamátkinázy, načež se amonné ionty ostraní dialýzou a aktivita glutamátkinázy stanoví spektrofotometricky. Zvýšená akumulace prolinu stresem odpovídá „zpětnou vazbou“ inhibičnímu působení na enzym glutamátkinázu.

Posklizňový rozbor, hodnotící délky klasu a počet zrn v klasu se dělal na 30 rostlinách od varianty ošetření, výnos z plochy  $1 \text{ m}^2$  a HTS se stanovil v 8 opakování, z nichž se dělal přepočet na hektarový výnos.

Tabulka 15

Posklizňový rozbor a aktivita glutamátkinázy (GK) po ošetření vybranými cytokininy (BAP – 6-benzylaminopurin, BAPR – 6-benzylaminopurin ribosid, 3CIBAPR – 6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 3BrBAPR – 6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 3,4CIBAPR – 6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid)

	HTS (%)	$\Sigma$ klasů/ $\text{m}^2$ (%)	Výnos (%)	$\Sigma$ zrn/klas (%)	GK%
Kontrola	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BAP	102,0	101,1	115,4	111,9	108,2

BAPR	103,8	102,7	121,9	114,3	154,1
3ClBAPR	108,3	100,5	128,8	119,1	124,7
3Br BAPR	101,5	104,9	131,8	123,8	116,6
3,4 Cl BAPR	101,5	99,7	113,3	111,9	114,2

### Příklad 18

#### Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0.25 g jedné ze sloučenin o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících příkladech, se připraví následujícím postupem:

#### Složení

Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
Pšeničný škrob	120 g
Magnesium stearát	80 g
Laktosa	20 g

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0.6 mm. Dávka 0.33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

### Příklad 19

#### Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0.05 g jedné z látek o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících Příkladech, se připraví následujícím postupem:

#### Složení

Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu<sup>®</sup> (propylenglykol laurát, Gattefoseé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0.419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

## Příklad 20

### Měkké tobolky

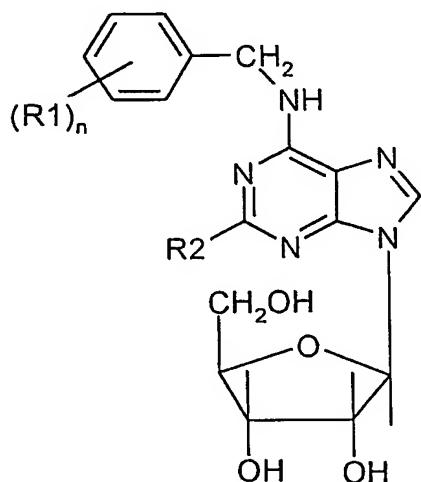
5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0.05 g jedné ze sloučenin o vzorci I, II a III zmíněných v předcházejících nebo následujících Příkladech, se připraví následujícím postupem:

#### Složení

Aktivní složka	250g
PEG 400	1 litr
Tween 80	1 litr

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylen glykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween<sup>®</sup> 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0.43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu obecného vzorce I

I

a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve kterém R2 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, methylmerkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl skupinu, a (R1)<sub>n</sub>, ve které

n znamená druhý až šestý uhlíkový atom fenylu substituovaný jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující R1 kde

R1 znamená atom vodíku, hydroxyl, halogen, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, methylmerkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl nebo karbamoyl alkyl, substituovaný alkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloalkylalkyl, arylalkyl, heteroalkyl, heteroarylalkyl, cykloheteroalkyl alkyl nebo R1'-X, ve které

X znamená NH-, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl)-, skupinu -O- nebo skupinu -S- a

R1' znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, acyl, amido, sulfo, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, aryl, substituovaný aryl, heterocyklus, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, arylalkyl, cykloheteroalkyl, substituovaný

cykloheteroalkyl, heteroarylalkyl, heteroalkyl, cykloalkyl alkyl a cykloheteroalkyl alkyl.

přičemž uvedené dosud nevymezené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, přičemž

halogen znamená

atom halogenu vybraný ze skupiny zahrnující atom fluoru, atom bromu, atom chloru a atom jodu,

alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

substituovaný alkyl znamená

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinou, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbyloxy znamená

.skupinu  $-OR_a$ , ve které  $R_a$  znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

karbylmerkapto znamená

.skupinu  $-SR_b$ , ve které  $R_b$  znamená alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfo znamená  $-SO_3R_c$ , ve které  $R_c$  znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jednímaž pěti substituenty zvoleným ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

sulfoamido znamená  $-\text{NHSO}_3\text{R}_d$ , kde  $\text{R}_d$  znamená

atom vodíku H,

.přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
.přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

acyl znamená

.skupinu  $-\text{C}(\text{O})\text{R}_e$ , ve které  $\text{R}_e$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

aryloxy znamená

.skupinu  $-\text{OAr}$ , ve které  $\text{Ar}$  znamená aryl, substituovaný aryl, heteroaryl nebo substituovaný heteroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### alkylamino znamená

.skupinu  $NR_fR'_g$ , ve které  $R_f$  a  $R'_g$  nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### amido znamená

.skupinu  $-C(O)NR_hR'_i$ , ve které  $R_h$  a  $R'_i$  nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karboxyl znamená

.skupinu  $-C(O)OR_j$ , ve které  $R_j$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### karbamino znamená

.skupinu  $-NHCOR_k$ , ve které  $R_k$  znamená atom vodíku, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, hetaroaryl nebo substituovaný hetaroaryl, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### aryl znamená

.aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem jako fenyl nebo bifenyl) nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl,

### substituovaný aryl znamená

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický jako 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy,

alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

**heterocyklus znamená**

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku,

**heteroaryl znamená**

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický,

**substituovaný heteroaryl znamená**

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

**arylalkyl znamená**

skupinu -R<sub>1</sub>-Ar, kde Ar znamená arylovou skupinu a R<sub>1</sub> znamená

přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,

přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,

aromatickou karbocyklickou skupinu obsahující 6 až 18 uhlíkových atomů a tvořenou alespoň jedním aromatickým kruhem například fenyl nebo bifenyl nebo násobně kondenzovanými kruhy, z nichž alespoň jeden kruh je aromatický například 1,2,3,4-tetrahydronaftyl, naftyl, antryl nebo fenantryl a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### heteroalkyl znamená

skupinu  $-R_m-L$ , ve které  $R_m$  znamená

přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a  $L$  znamená

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku a případně substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

### heteroarylalkyl znamená

skupinu  $-R_n-G$ , ve které  $R_n$  znamená

přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,  
 přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a  $G$  znamená

heterocyklickou skupinu obsahující 4 až 9 uhlíkových atomů a alespoň jeden heteroatom ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry a atom dusíku, přičemž alespoň jeden heterocyklický kruh této skupiny je aromatickým kruhem, která může být případně substituována jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů,

substituovaný cycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

heterocycloalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atom fosforu,

substituovaný cykloheteroalkyl znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku nebo atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

cykloalkylalkyl znamená

skupinu  $-R_o-J$ , ve které  $R_o$  znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a  $J$  znamená

- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, nebo
- .monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě, a

a heterocycloalkylalkyl znamená

skupinu  $-R_pV$ , ve které  $R_p$  znamená

- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkenylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkinylovou skupinu obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů,
- .přímou nebo rozvětvenou alkylovou, alkenylovou nebo alkinylovou skupinu obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické

substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

a V znamená

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu,

monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 15 uhlíkových atomů, v jejíž cyklické struktuře je alespoň jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem ze skupiny zahrnující atom kyslíku, atom síry, atom dusíku a atom fosforu, a substituovanou jedním až pěti substituenty vybranými ze skupiny zahrnující hydroxyl, alkoxy, amino, hydrazo, merkapto, karboxyl, cyano, nitro, amido, sulfo, sulfamido, acylamino, acyloxy, alkylamino, dialkylamino, alkylmerkapto, karbylalkoxy, cykloalkyl a karbamoyl skupinu, přičemž uvedené generické substituentové skupiny mají významy, které jsou identické s definicemi odpovídajících skupin uvedenými v této legendě,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

2. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce 1 vybrané ze skupiny zahrnující

6-(2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fluorobenzylamino)purin
6-(2-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-bromobenzylamino)purin
6-(4-bromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-iodobenzylamino)purin
6-(3-iodobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chlorobenzylamino)purin
6-(2-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-chlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-chlorobenzylamino)purin
6-(2-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetylbenzylamino)purin
6-(4-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-acetylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetylbenzylamino)purin
6-(4-karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-karboxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-karboxybenzylamino)purin
6-(3-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-acetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-acetoxybenzylamino)purin
6-(2-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-nitrobenzylamino)purin
6-(4-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-nitrobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-nitrobenzylamino)purin
6-(3-sulfoobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-sulfoobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-sulfoobenzylamino)purin

sulfobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-kyanobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-nitro-2-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-methylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
methylaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
hydroxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-hexylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
hexyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-formylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-
ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
ethoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-ethylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
pentylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-pentyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
fenoxylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-fenylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
propylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-propyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
oktylbenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-octyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(4-
ethyloxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-
diacetoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-diaminobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-
dibromobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dibromo-4-methoxybenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,3-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,4-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,6-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-
dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-dichlorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,4,5-
tetrafluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-
chloro-2-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(3,4,5-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3-
chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-
(2,6-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,4-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,4-
difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(2,5-difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(3,5-
difluorobenzylamino)purin	ribosid,	6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chloro-5-
6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin	ribosid,	6-(2-chloro-5-
6-(2-(difluoromethoxy)benzylamino)purin	ribosid,	6-(3-(difluoromethoxy)benzylamino)purin	ribosid,	6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin

ribosid, 6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin purin ribosid, 6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-fluoro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)puri ribosid, 6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl) benzylamino)purin ribosid, 6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2-

methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,5-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4,5,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4,5-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trihydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid,

6-(2-hydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dihydroxy-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-4-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-bromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-iodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-diiodobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dihydroxy-3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3,4-diiodo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin

ribosid, 6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-buty1/benzylamino)purin ribosid, 6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-iodobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chlorobenzylamino)purin

ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-karboxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-karboxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-acetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-sulfobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-kyanobenzylamino)purin ribosid, 6-(4-kyanobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-nitro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methylbenzylamino)purin ribosid, 6-(4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methylaminobenzylamino)purin ribosid, 6-(2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro,

bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hexylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hexyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-formylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-pentylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-penthyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fenoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fenylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-propylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-propyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-oktylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-octyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-ethyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diacetoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-diacetoxybenzylamino)purin ribosid, 6-(2,5-diaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino,

hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4,5-tetrafluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trifluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(difluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy,

chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-fluoro-3-methylbenzylamino)purin purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-difluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-difluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-6-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methyl benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-fluoro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,6-difluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethylthio)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(2-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethoxy)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-(trifluoromethyl)benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-diethylaminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-ethylenedioxybenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo



methylmercapto)-6-(4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-2,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-2,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-hydroxy-3,6-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxy-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo





chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-fluoro-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-fluoro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-methyl-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-methyl-4-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,4-diido-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-3,4-dimethoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3,5-dinitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-2-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-chloro-4-methylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-methoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloromethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-5-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-chloro-6-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-chloro-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-chloro-2-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-hydroxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-bromo-4-methoxybenzylamino)purin, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-bromomethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-butoxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butyl/benzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-t-butyl-2,6-dimethylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-aminobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-2-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-5-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-amino-6-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,6-diamino-4-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl

nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-chlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-5-dichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(5-amino-2-methylbenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-amino-3-nitrobenzylamino)purine ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-amino-3-nitrobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(4-benzyloxybenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(3-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2-acetylbenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,4,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,4-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 6-(2,3,5-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,3,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid, 2-(amino, hydroxy, chloro, fluoro, bromo, methyl nebo methylmercapto)-6-(2,5,6-trichlorobenzylamino)purin ribosid.

3. Způsob přípravy substitučního derivátu  $N^6$ -benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R1 a R2 mají stejně významy jako v nároku 1, vyznačený tím, že se 6-chlor, brom, fluoro nebo methylthio derivát obecného vzorce I nukleofilně substituuje v poloze

6 za účelem převedení atomu chloru, fluoro nebo bromu v poloze 6 za některý jiný z významů obecného substituentu v poloze  $N^6$  za vzniku derivátu obecného vzorce I.

4. Substituční deriváty  $N^6$ -benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

5. Substituční deriváty  $N^6$ -benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstové regulátory rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

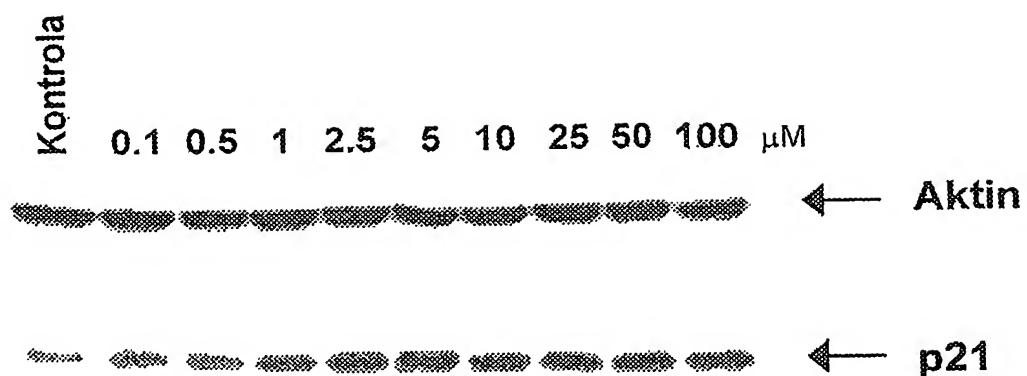
6. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako kosmetické přípravky.
7. Farmaceutické, kosmetické a tkáňové přípravky obsahující sloučeninu obecného vzorce I či farmaceuticky přijatelnou sůl takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče.
8. Použití sloučenin obecného vzorce I při přípravě afinitních adsorpčních nosičů, imobilizovaných enzymů pro kontrolu výrobních procesů, reagencií pro imunodetekci, diagnostických vzorků, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, avidinem a biotinem značených sloučenin a oligonukleotidů.
9. Použití substitučního derivátu N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I nebo farmaceuticky přijatelných solí takovéto sloučeniny včetně farmaceutického nosiče pro přípravu farmaceutické kompozice použitelné jako mitotikum či antimitotikum, zejména při léčení nádorových onemocnění, při psoriáze, revmatické artritis, lupusu, diabetu I typu, roztroušené skleróze, restenóze, polycystickému onemocnění ledvin, host graft disease a dny, parazitozách způsobených houbami anebo prvoky, Alzheimerově chorobě, anebo jako antineurogenerativního léčiva, anebo k supresi immunostimulace, anebo k léčení proliferačních onemocnění kůže.
10. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v zemědělství, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.
11. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako kosmetického přípravku pro zpomalení senescence savčích pokožkových buněk, jako keratinocytů či fibroblastů.
12. Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro použití jako růstového regulátoru v tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.
13. Použití substitučních derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce I pro výrobu přípravků používaných ke klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

14. Použití substitučních derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinu podle nároku 1 obecného vzorce 1 pro výrobu léčiva na potlačení imunostimulace například arthritis nebo při supresi rejekce transplantovaných orgánů u savců.

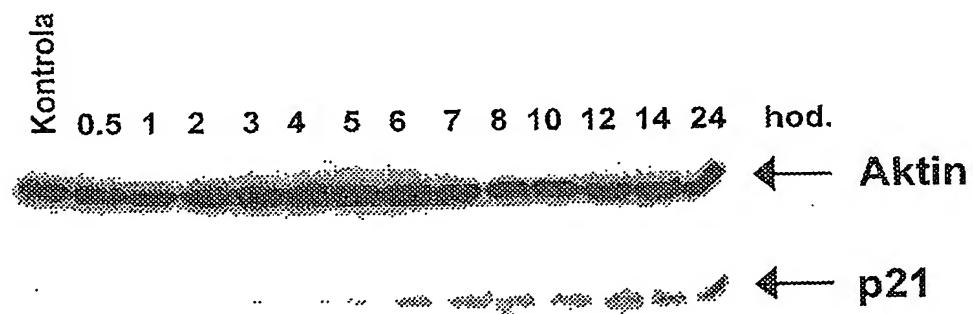
## Anotace

Název: Substituční deriváty N<sup>6</sup>-benzyladenosinu, způsob jejich přípravy, jejich použití pro přípravu léčiv, kosmetických přípravků a růstových regulátorů, farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory tyto sloučeniny obsahující

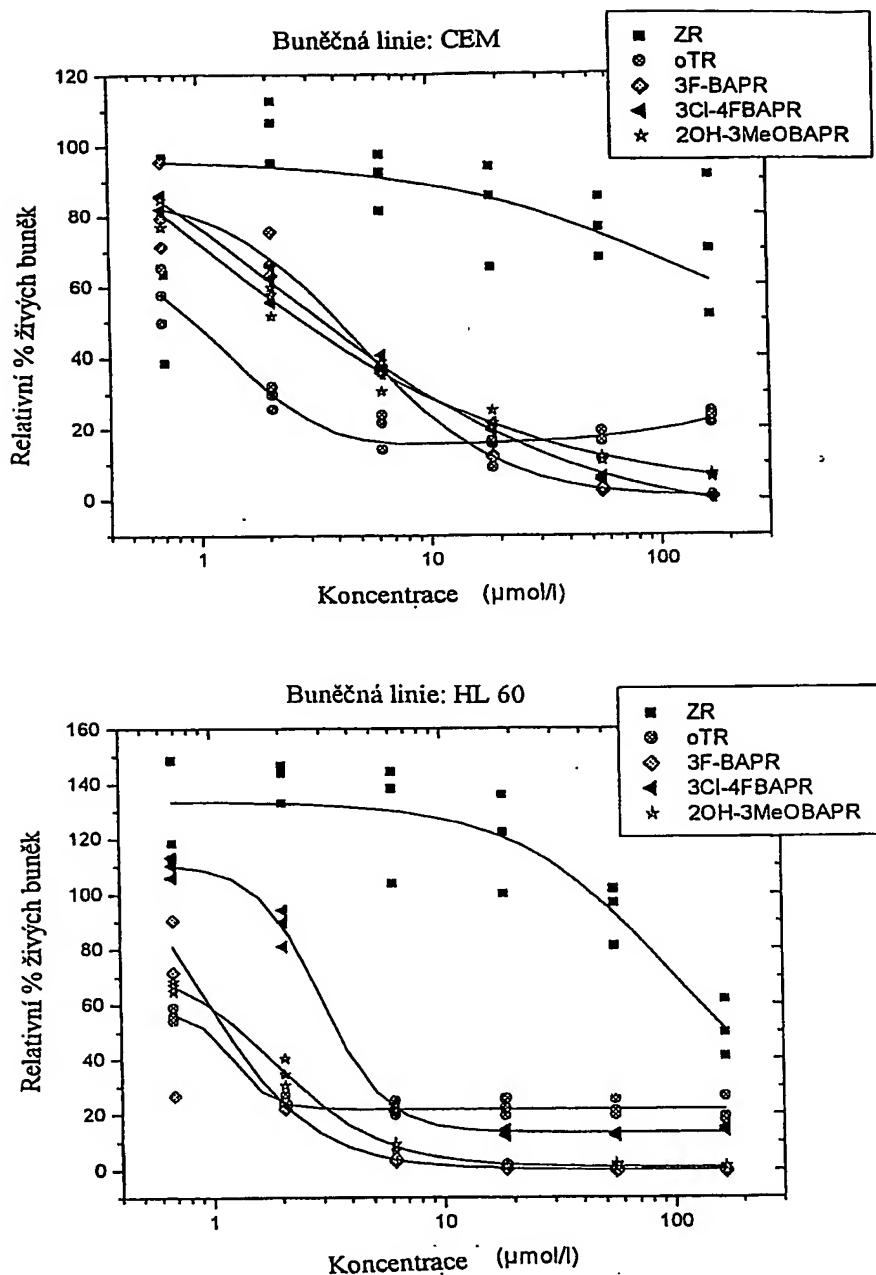
Řešení se týká nových substitučních derivátů N<sup>6</sup>-benzyladenosinu, které mají protinádorové, mitotické, imunosupresivní a antisenescenční účinky pro rostlinné, živočišné i lidské buňky a způsobu přípravy těchto derivátů. Zahrnuté jsou rovněž farmaceutické přípravky, kosmetické přípravky a růstové regulátory obsahující tyto deriváty jako účinnou látku a použití těchto derivátů pro výrobu léčiv, v biotechnologických, v kosmetickém průmyslu a v zemědělství.



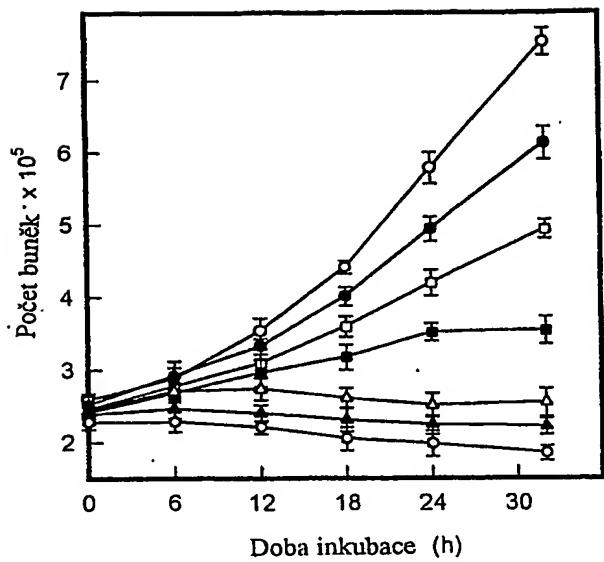
Obr.1: Indukce proteinu  $\text{p21}^{\text{WAF-1}}$  v buňkách MCF-7 působením rozdílných koncentrací 2OH3MeOBAPR v řádu jednotek  $\mu\text{mol}$  na litr kultivačního média.



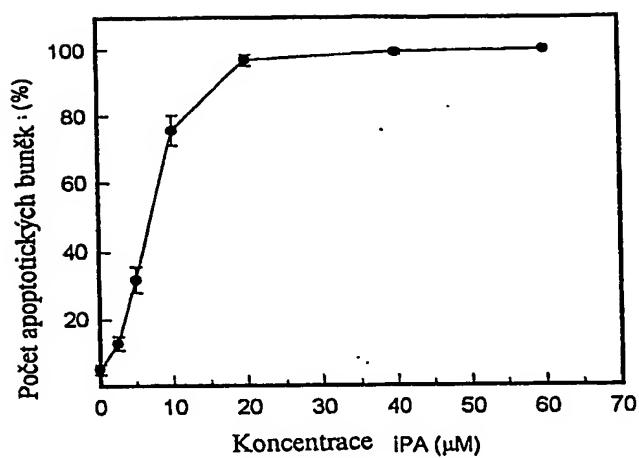
Obr. 2: Indukce  $\text{p21}^{\text{WAF-1}}$  v buňkách MCF-7 v rozmezí 6-24 hodin po přidavku 2OH3MeOBAPR v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci.



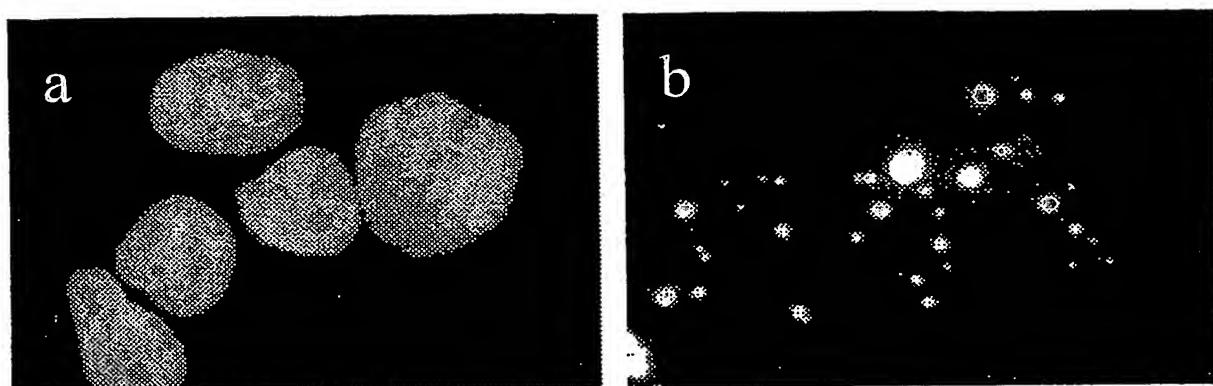
Obr. 3: Inhibice růstu nádorových buněčných linií CEM (A) a HL60 (B) novými cytokininy. Cytotoxicita byla stanovena pomocí testu Calcein AM. Aktivita je vyjádřena v procentech maximální aktivity (v nepřítomnosti inhibitoru). ZR: zeatin ribosid; oTR: *ortho*-topolin ribosid; 3F-BAPR: 6-(3-fluorobenzylamino)purin ribosid; 3CI-4FBAPR: 6-(3-chloro-4-fluorobenzylamino)purin ribosid; 2OH3MeOBAPR: 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid.



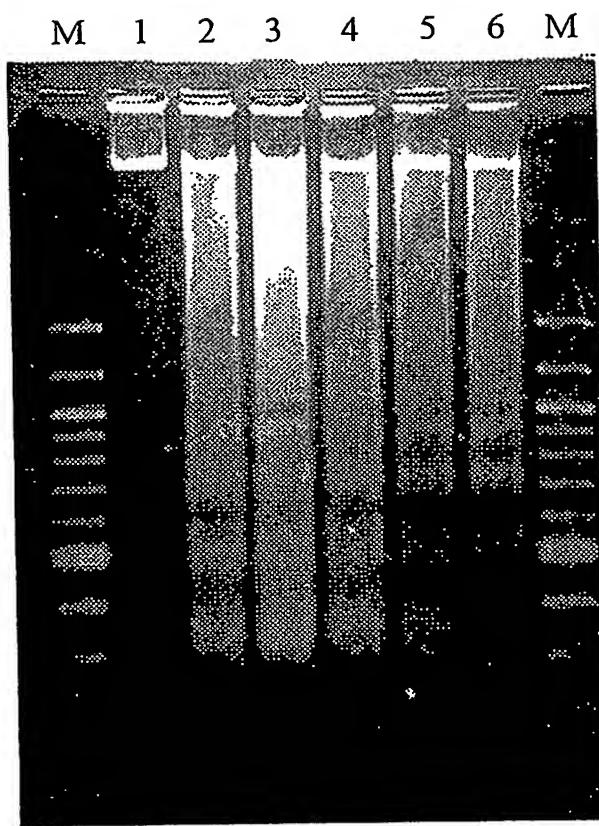
Obr. 4. Inhibice proliferace buněk HL-60 indukovaná 2OH3MeOBAPR. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v koncentraci  $2.5\mu\text{M}$  (plné kroužky),  $5\mu\text{M}$  (prázdné čtverce),  $10\mu\text{M}$  (plné čtverce),  $20\mu\text{M}$  (prázdné trojúhelníky),  $40\mu\text{M}$  (plné trojúhelníky) a  $60\mu\text{M}$  (prázdné šestiúhelníky). Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola (prázdné kroužky).



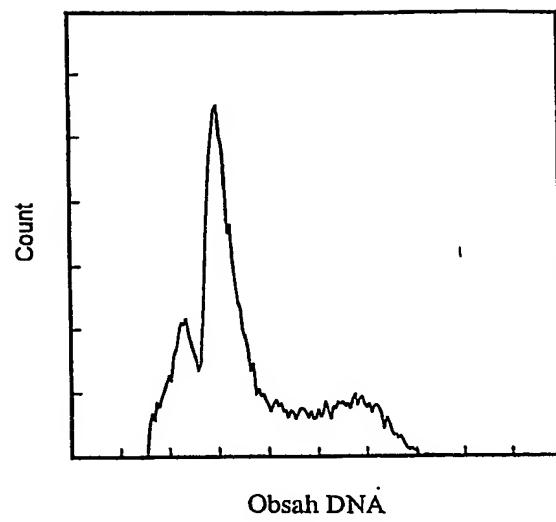
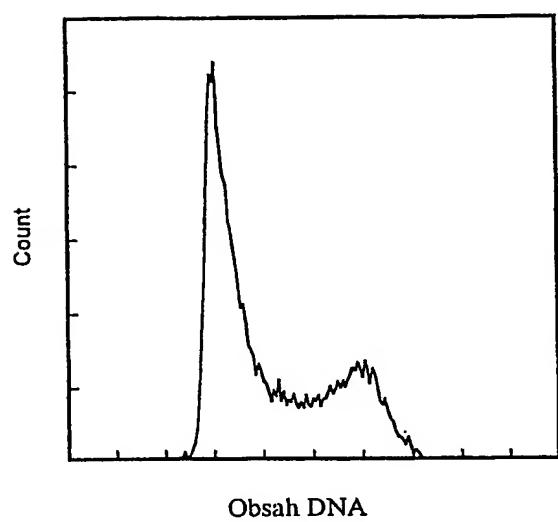
Obr. 5. Indukce apoptozy 2OH3MeOBAPR u buněk HL-60. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 2OH3MeOBAPR v uvedených koncentracích. Po 24 h inkubaci byl sledován výskyt apoptotických buněk vzhledem k morfologii jader. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR sloužily jako kontrola.



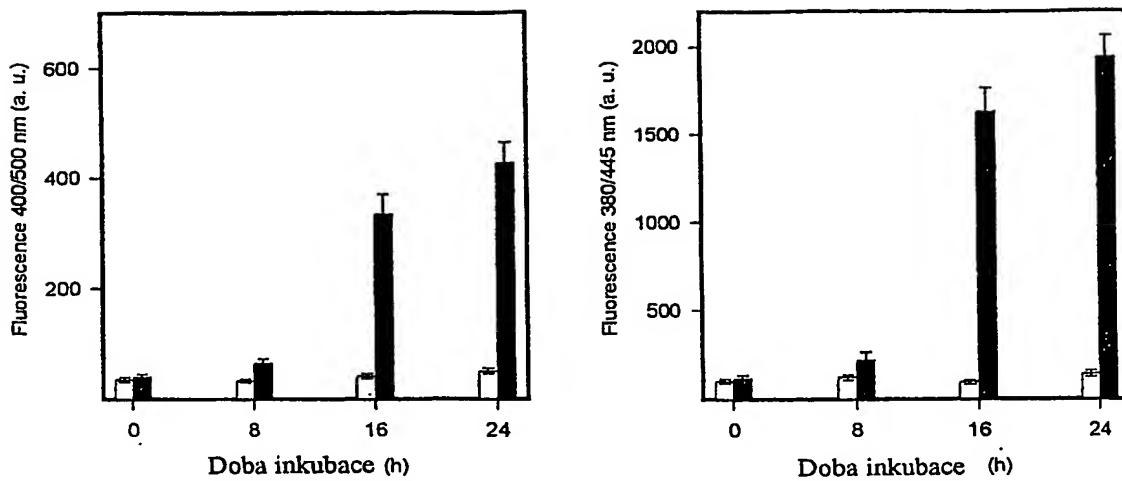
Obr. 6. Vliv 2OH3MeOBAPR na morfologii jader u buněk HL-60. Jádra buněk kultivovaných za standardních podmínek v médiu bez 2OH3MeOBAPR a), jádra buněk kultivovaných v médiu s přívkem  $5 \mu\text{M}$  2OH3MeOBAPR po dobu 24 hodin b).



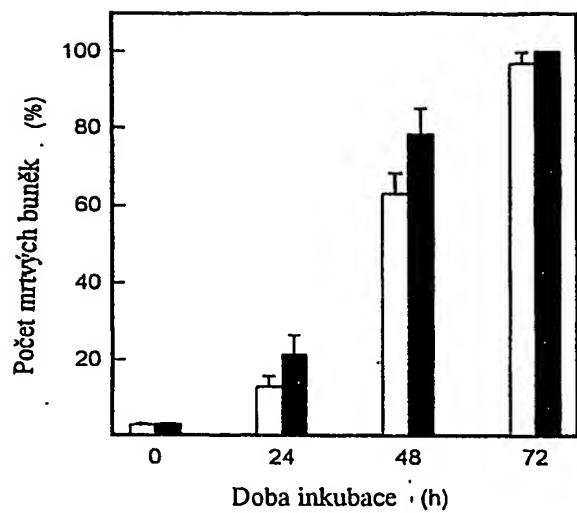
Obr. 7. Vliv 2OH3MeOBAPR na integritu jaderné DNA u buněk HL-60. M - standardy molekulové hmotnosti. Pozice 1- DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu bez iPA. Pozice 2-6 DNA izolovaná z buněk kultivovaných v médiu s přídavkem 5, 10, 20 40 a 60  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24 h.



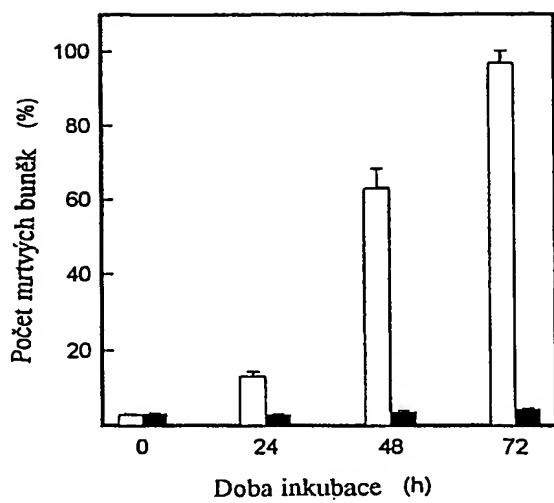
Obr. 8. Vliv 2OH3MeOBAPR (6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin ribosid) na buněčný cyklus. Buňky byly kultivovány a) ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR (kontrola), b) v médiu obsahujícím 5  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR po dobu 24h před analýzou pomocí průtokové cytometrie.



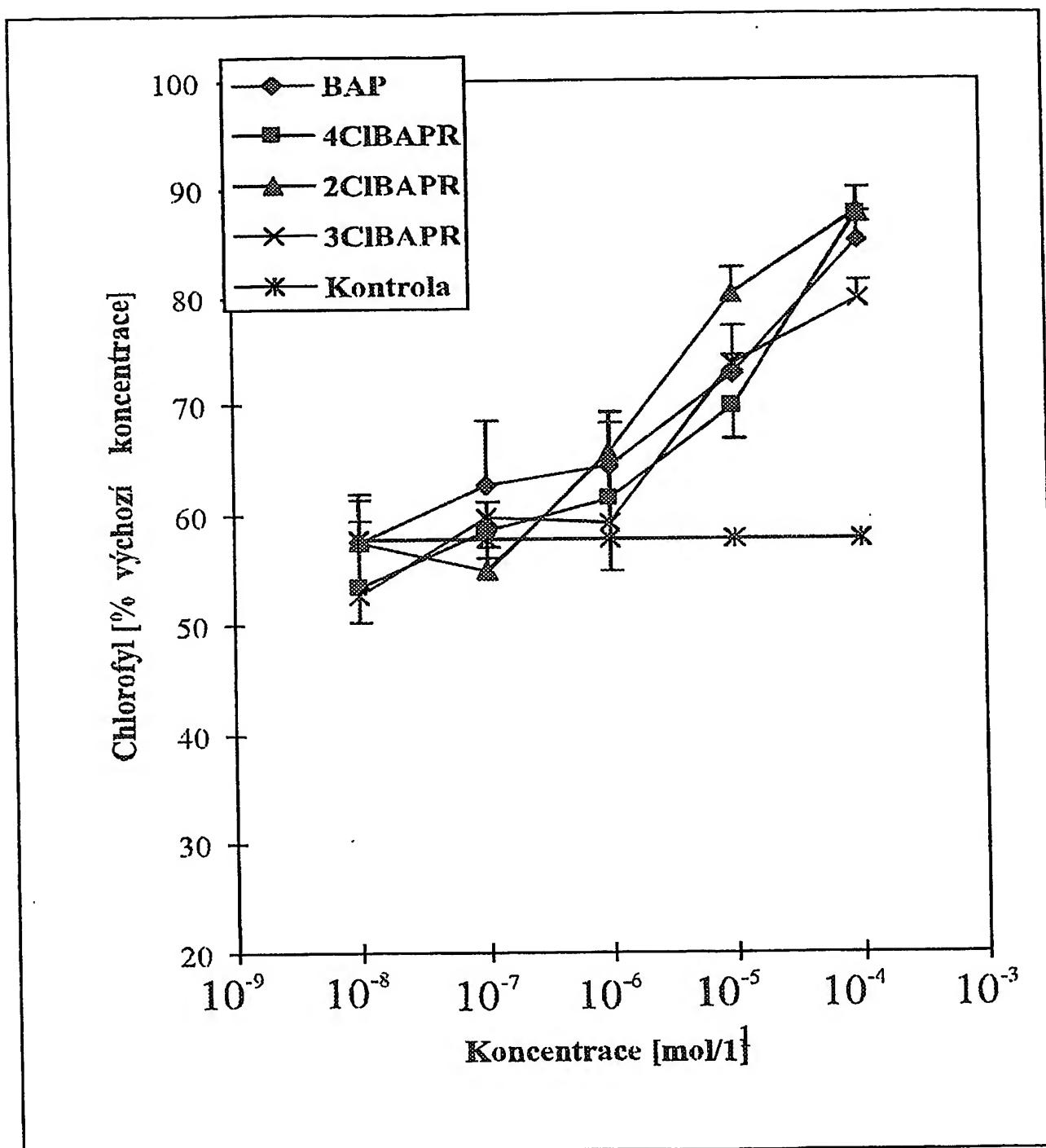
Obr. 9. Vliv 2OH3MeOBAPR na aktivaci kaspázových proteáz. Buňky kultivované ve standardním médiu bez 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce), buňky kultivované v médiu obsahujícím 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (černé sloupce). Relativní hydrolýza substrátu pro kaspázu-9 Ac-LEHD-AFC a) a kaspázu-3 Ac-DEVD-AMC b).



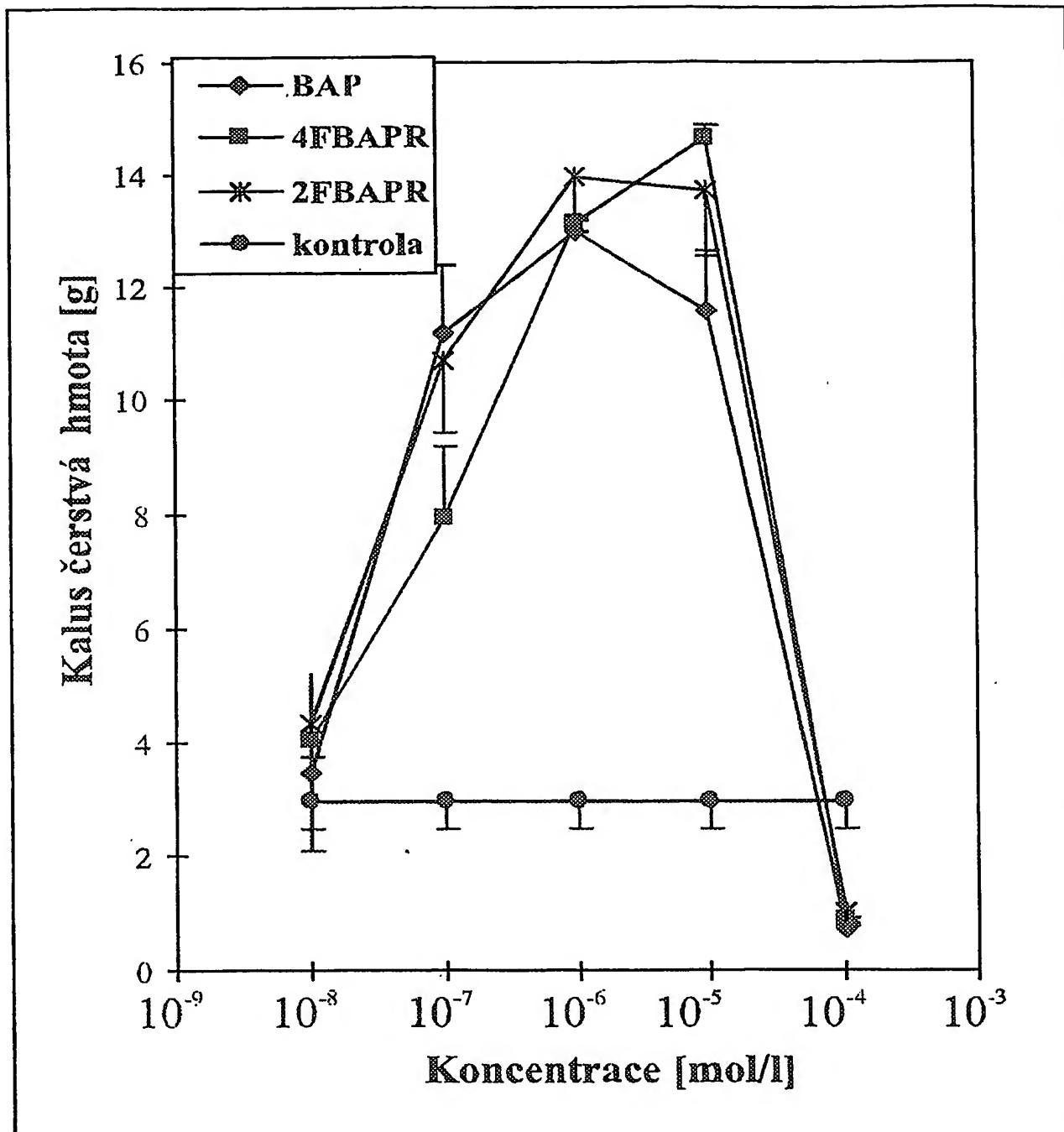
Obr. 10: Vliv kaspázového inhibitoru Z-VAD-FMK na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 50 $\mu$ M Z-VAD-FMK (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.



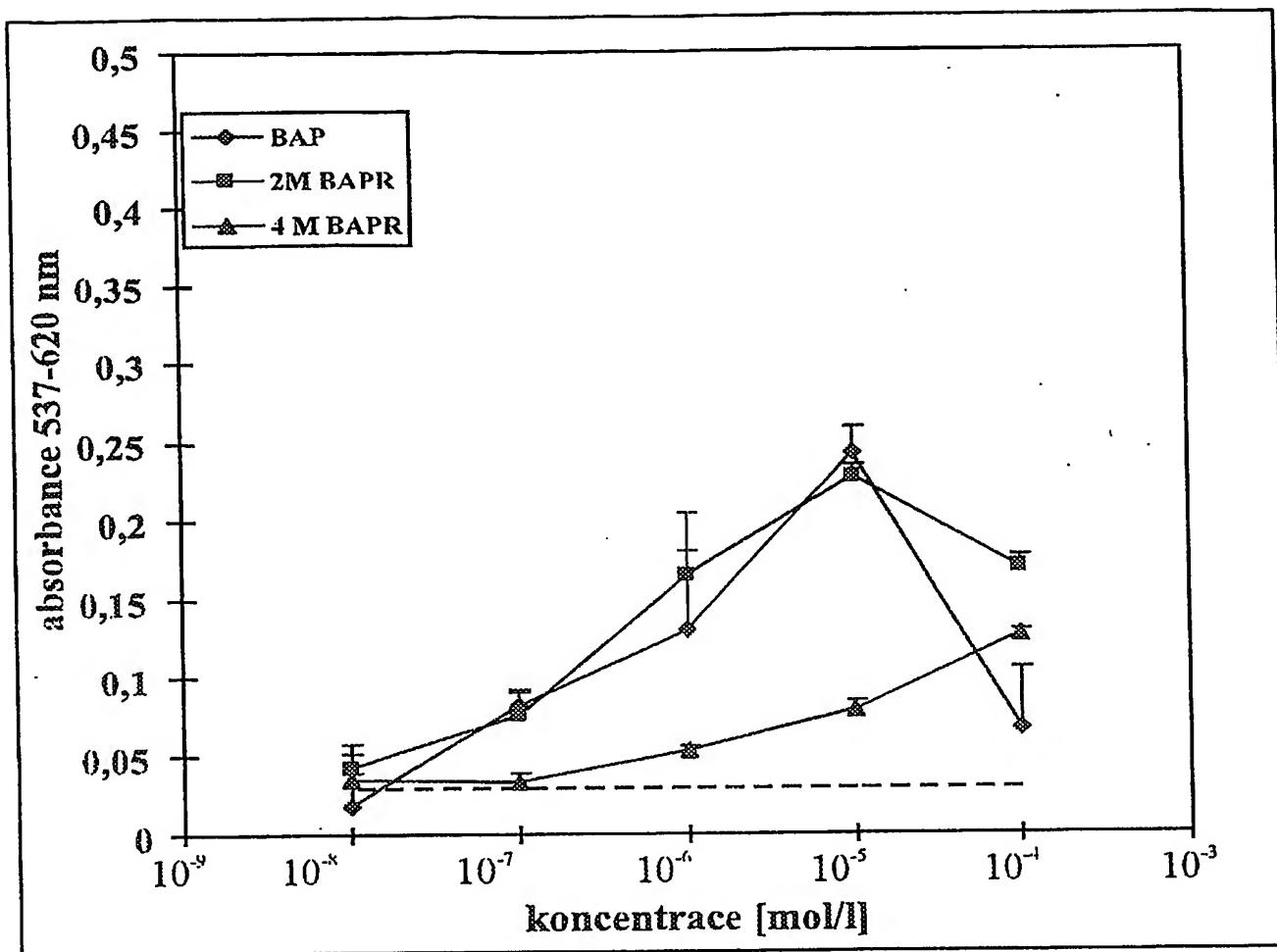
Obr. 11: Vliv inhibitoru adenosin kinázy 4-amino-3-iodo-1 $\beta$ -D-ribofuranosylpyrazolo [3,4-d]-pyrimidine (AIRPP), na viabilitu buněk HL-60 kultivovaných v přítomnosti iPA. K exponenciálně rostoucím buňkám byl přidán 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR (bílé sloupce) a 20  $\mu$ M 2OH3MeOBAPR v kombinaci s 1 $\mu$ M AIRPP (černé sloupce) a buňky byly kultivovány 72h. V průběhu inkubace byla stanovována viabilita buněk pomocí kombinovaného barvení FDA/PI.



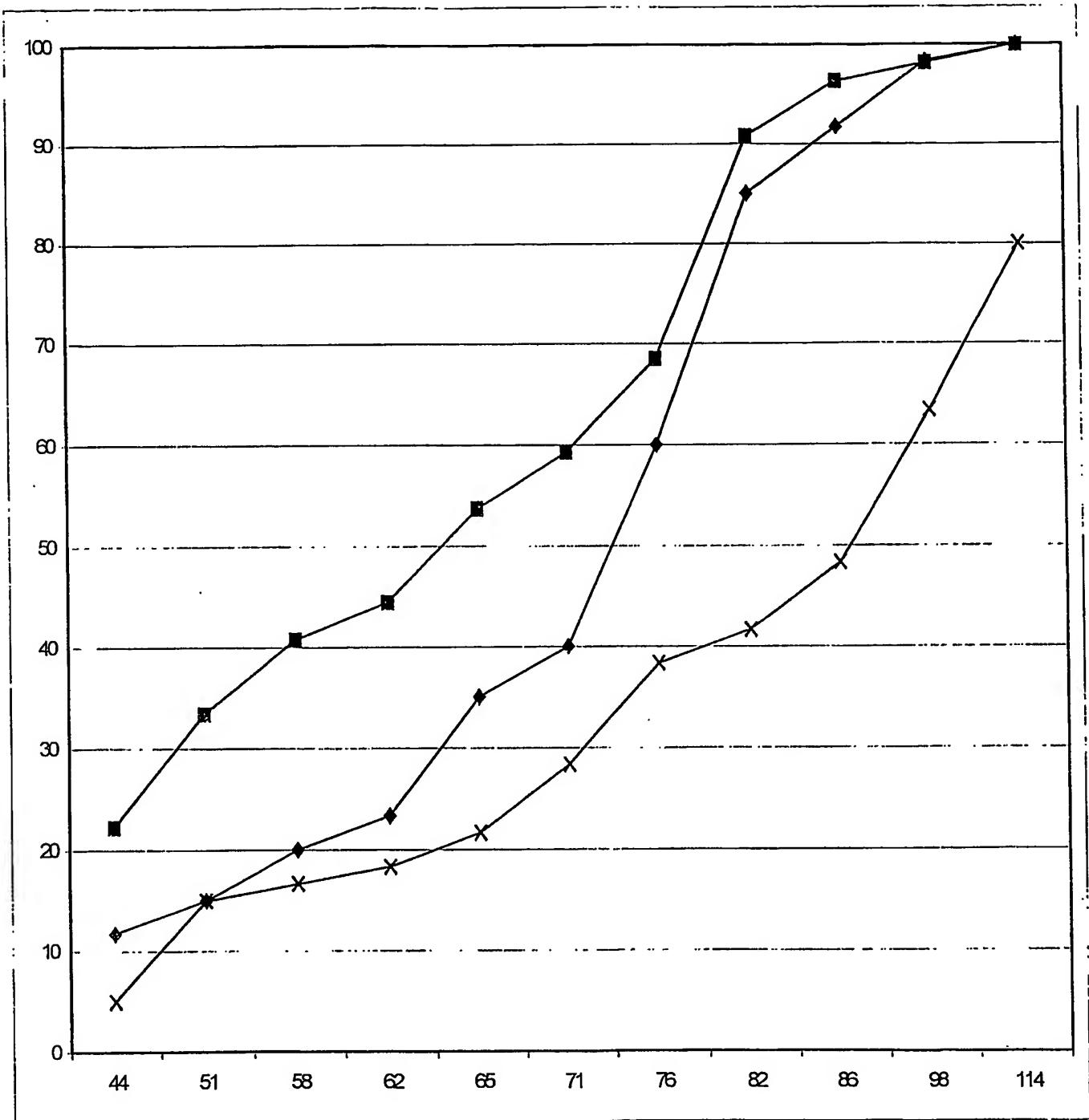
Obr. 12: Vliv nových cytokininů na retenci chlorofylu v extirpovaných listových segmentech pšenice. Prezentované hodnoty jsou vyjádřeny v % výchozího obsahu chlorofylu v čerstvých listech před inkubací s cytokininy. Přerušovaná čára představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $57,7 \pm 0,9$ .



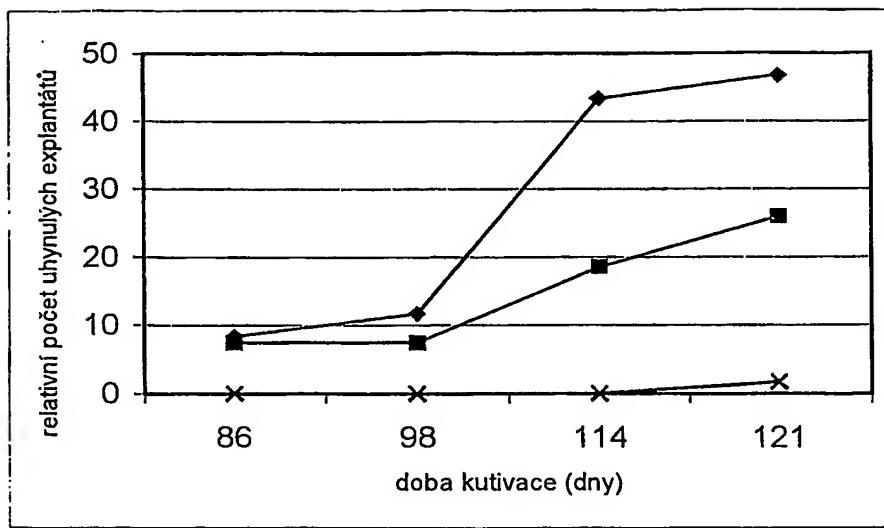
Obr. 13: Vliv nových cytokininů na růst cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Přímka —— představuje kontrolní měření bez přítomnosti cytokininů, tj.  $2,5 \pm 0,3$  g.



Obr. 14: Vliv nových cytokininů na syntézu betacyaninu v kotyledonárních/hypokotylárních explantátech *Amaranthus caudatus*. Prezentované hodnoty představují rozdíly v jednotkách O.D. mezi absorbancí při 537 a 620 nm.



Obr. 15. Relativní počet explantátů s alespoň jedním hnědým listem v závislosti na čase  
 (■: BAP, ◆: mT, ▲: mMeOBAPR)



Obr. 16. Relativní počet uhynulých explantátů v závislosti na čase (■: BA, ◆: mT, ▲: mMeOBAPR)



Obr 17. Vlevo: uhynulý explantát *Rosa hybrida* na mediu obsahujícím BAP; vpravo: zdravý explantát *Rosa hybrida* na mediu s mMeOBAPR po 121 dnech kultivace